

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**Interacciones entre bifenilos policlorados y saccharomices
cerevisiae y su significado en la contaminación ambiental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María José González Carlos

Madrid, 2015

María José González Carlos



x-53-041160-4

INTERACCIONES ENTRE BIFENILOS POLICLORADOS
Y SACCHAROMICES CEREVISIAE Y SU SIGNIFICADO
EN LA CONTAMINACION AMBIENTAL

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© María José González Carlos
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-39407-1980

Autor: MARIA JOSE GONZALEZ CARLOS

INTERACCIONES ENTRE BIFENILOS POLICLORADOS Y SACCARO-
NICOS CEREVISIAE Y SU SIGNIFICADO EN LA CONTAMINACION
AMBIENTAL:

Director: Dr D. Gonzalo Baluja Marcos

Profesor de Investigación del C.S.I.C

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Orgánica

Año: 1980

Instituto de Química Orgánica General

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Química Orgánica General, bajo la dirección del Dr. D. Gonzalo Baluja Marcos, a quien expreso mi más sincero - agradecimiento.

Asimismo, he de mostrar mi agradecimiento al Dr. D. Luis Manuel Hernández Saint-Aubin por las orientaciones que de todo tipo me ha proporcionado.

También he de expresar mi agradecimiento al Dr. D. José María López Sancho por su colaboración en el tratamiento matemático de los resultados numéricos.

Finalmente, debo hacer constar mi gratitud a mis compañeros de laboratorio: María Cristina Tejedor Gil-martín y José Antonio Lázaro Campos por su constante - colaboración, y a todas aquellas personas que con su - ayuda han hecho posible la realización de esta Memoria.

Madrid, Enero de 1.980

I N D I C EPág.

I - CONSIDERACIONES TEORICAS

1. Introducción Histórica	1
2. Compuestos Xenobióticos	5
3. Bifenilos Policlorados (PCBs)	8
4. Ingreso y dinámica en el medio ambiente de los PCBs	11
5. Toxicidad de los PCBs	18
6. Persistencia en el medio de los PCBs.	23
7. Transformaciones abióticas y bióticas de los PCBs	26
8. Interacciones entre microorganismos y PCBs . .	43
9. Alcance y justificación del presente trabajo .	50

II - MATERIALES Y METODOLOGIA

1. Técnicas de cultivo del <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
2. Incorporación de los PCBs a los medios de cul- tivo	57
3. Extracción de los PCBs	59
4. Purificación de los extractos	61

Pág.

5. Determinación de los PCBs por cromatografía gas-líquido.	64
6. Cuantificación de PCBs	67
7. Estudio de la fracción lipídica.	69
7.1. Extracción y purificación de lípidos . .	69
7.2. Determinación de lípidos totales y fosforo	71
7.3. Separación de las fracciones saponificable e insaponificable	75
7.4. Purificación de la fracción saponificable	77
7.4.1. Metilación de los ácidos grasos en el extracto	78
7.4.2. Condiciones de la cromatografía gas-líquido	80
7.4.3. Identificación y determinación cuantitativa de los ácidos grasos	82
7.5. Purificación de la fracción insaponificable	85
7.5.1. Preparación de derivados de esteroides contenidos en los extractos	87
7.5.2. Condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación de los esteroides	90
8. Influencia de los PCBs en actividades básicas del <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	94

Pág.

8.1. Determinación de la actividad catalásica	95
8.2. Determinación de la capacidad fermentativa	98
8.3. Determinación de la actividad alcohol des- hidrogenásica	103

III - RESULTADOS Y SU INTERPRETACION

1. Incidencia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre mezclas de PCBs	106
2. Incidencia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre PCBs individuales	109
3. Respuesta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a la pre- sencia de mezclas de PCBs	111
4. Respuesta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a la pre- sencia de PCBs individuales	123
5. Acumulación de PCBs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	126
6. Naturaleza del proceso de acumulación del PCBs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	135
7. Incidencia de los PCBs sobre la fracción lipí- dica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	143
7.1. Incidencia de los PCBs sobre los ácidos grasos integrantes de la subfracción sa- ponificable	156

7.2. Incidencia de los PCBs sobre los esteroides integrantes de la subfracción insaponifica- ble	176
8. Incidencia de los PCBs sobre la actividad ca- talásica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	189
9. Incidencia de los PCBs sobre la capacidad fer- mentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	195
10. Incidencia de los PCBs sobre la actividad alco- hol deshidrogenásica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	204
IV - CONCLUSIONES	209
V - BIBLIOGRAFIA	216

I. CONSIDERACIONES TEORICAS

1. INTRODUCCION HISTORICA

La influencia del hombre sobre el medio ambiente data de su aparición sobre la tierra, y sin lugar a dudas ha supuesto a lo largo del tiempo una regresión de los sistemas naturales, en relación con el estado que podría suponerse más probable si la especie humana no hubiera existido. En el análisis histórico de la interacción entre el hombre y el resto de la biosfera, es indudable que en las primeras etapas dicha incidencia fué muy escasa, quedando su acción reducida a algunos ecosistemas mediante el fuego. Es durante la Edad Media y principios de la Moderna cuando el hombre inicia la tala abusiva de bosques con objeto de facilitar la agricultura y la ganadería, lo que dió lugar a que amplias extensiones quedaran convertidas en tierras áridas y desiertos. Ya en la Edad Moderna, y a consecuencia de las concentraciones humanas crecientes, el hombre comienza a ser consciente del peligro que representa la existencia de un entorno contaminado por él mismo; buenos ejemplos de ello son las disposiciones legislativas decretadas en Francia por Carlos VI acerca de la emisión de gases malolientes. Pero es a partir del siglo XIX cuando, con el advenimiento de la revolución industrial, se procede un aumento considerable de esta

contaminación, en condiciones tales que las relaciones entre el hombre y su medio ambiente se encuentra totalmente alteradas. En efecto, hasta 1.800 la energía disponible tenía su origen y se limitaba a la radiación solar. De igual modo, hasta aquella fecha, la producción de materiales por parte - del hombre, como un proceso sustancialmente biosférico, era relativamente limitada, pues durante cientos de años su demanda había sido modesta y además, aquellos eran, por lo general biodegradables.

Con la revolución industrial se introducen en el proceso de producción máquinas accionadas mediante nuevas fuentes de energía -producida a partir de combustibles sólidos- y cuyo consumo irá aumentando progresivamente.

Los efectos de la combustión de dichos productos pronto comenzaron a ejercer de forma progresiva sus efectos sobre la biosfera; asimismo, al aumentar la producción de materiales por parte del hombre, las consecuencias del no reciclaje de muchas sustancias se hacen cada vez más patentes en la - naturaleza. A todo ello hay que añadir los efectos que se - derivan del fenómeno de concentración urbana que tiene lugar en esta etapa y que es función directa del desarrollo industrial.

Pero el advenimiento del siglo XX trajo, desde el -
punto de vista que nos ocupa, algo más que un aumento de los
contaminantes. En efecto, el hombre sometido a una presión
demográfica sin precedentes y a unas formas de vida deriva-
das del crecimiento industrial, se vió obligado a remodelar
profundamente su ambiente natural para adaptarlo a sus pro-
pios fines, tarea que acometió no solo intensificando sus -
actuaciones tradicionales, sino también poniendo en juego -
toda una serie de recursos tecnológicos que, en ciertos casos
supone la introducción de nuevos factores y productos en el
ciclaje biogeoquímico natural de la materia. Ello conlleva
a una indudable alteración del equilibrio ecológico dado que
la biosfera, como sistema autoregulator que es, tiende a la
estabilidad, es decir, a conservar sus rasgos esenciales pa-
ra poder hacer frente a los posibles cambios o alteraciones
del medio ambiente. Entre dichos rasgos esenciales de la -
biosfera figura el de ser un sistema abierto, desde un pun-
to de vista energético, sometido a la acción de la energía -
solar, y un sistema cerrado desde el punto de vista de los -
materiales, de ahí la necesidad de reciclado de residuos.

Son numerosos los nuevos compuestos de síntesis, que
si bien han contribuído, en un principio, a la mejora de las
condiciones de vida humana o al perfeccionamiento de diferen-

tes procesos industriales, lo cierto es que a largo plazo se trata, desde el punto de vista ambiental, de tecnologías sumamente deficientes, en tanto en cuanto su desarrollo provoca consecuencias negativas que escapan al control humano.

Sin ánimo de hacer una exhaustiva relación de los posibles contaminantes, cabe referirse a los compuestos organoclorados utilizados, tanto como plaguicidas, en la lucha del hombre frente a los insectos, como en industrias plásticas, eléctricas, de lubricantes, etc.; a los compuestos organomercuriales empleados en el tratamiento de semillas, - industrias de pulpa y de papel, incineración de combustibles fósiles, y a los compuestos del plomo empleados como ingredientes antidetonantes en combustibles para motores, como plaguicidas, en la industria de pinturas, barnices, esmaltes, etc.

2. COMPUESTOS XENOBIOTICOS

El término xenobiótico -etimológicamente extraño o ajeno a la vida- ha sido acuñado durante la última década para designar todos aquellos compuestos orgánicos e inorgánicos de síntesis que no se articulan, o lo hacen muy defectuosamente, en los procesos bioquímicos de los seres vivos, aludiendo esencialmente a este carácter de ajeno a la dinámica natural que presentan diversos contaminantes que han alcanzado una gran dispersión en el medio ambiente durante las últimas décadas.

Existe una clara discrepancia acerca del alcance y límites de la anterior definición pero parece existir unanimidad acerca de su aplicación a nivel ecológico y más concretamente en el ámbito de la biodegradabilidad. En efecto, es claro que cuanto más tarde haya aparecido -de forma natural- una determinada especie molecular a lo largo de la evolución, menor será el número de seres vivos capaces de llevar a cabo su degradación. En el caso de los nuevos compuestos orgánicos de síntesis elaborados por el hombre en las últimas décadas, al hecho de su origen no natural unen su reciente incorporación a los ciclos biogeoquímicos que acontecen en el planeta. Desde esta perspectiva no puede sorprender que no existan especies biológicas capaces de llevar a cabo la degrada-

ción de un determinado compuesto xenobiótico, o bien que si ésta tiene lugar lo sea en tan escasa proporción o a un ritmo tan lento que no sea posible considerarla como un verdadero proceso degradativo. Una posible objeción que se podría hacer a lo anteriormente expuesto, radica en el hecho de que los microorganismos constituyen un grupo de seres vivos poseedores de una enorme capacidad de adaptación a los más diversos ambientes, bien mediante mecanismos genéticos que implican la selección de aquellos organismos que -debido a la producción de cepas mutantes- son capaces de crecer y reproducirse en el ambiente en cuestión, superando el equilibrio que tiende a establecerse a consecuencia de la retromutación, y de los mecanismos selectivos, bien mediante mecanismos fenotípicos, en los que sin que existan alteraciones de las características hereditarias de los organismos predominantes en cada población, cada uno de ellos adquiere la capacidad para crecer en el ambiente considerado.

Pero en la actualidad está constatada la existencia de un gran número de compuestos -sobre todo de naturaleza organoclorada- susceptibles de permanecer inalterados ante el -ataque por parte de los microorganismos y por ende capaces de persistir en el medio durante largos períodos de tiempo. Los compuestos xenobióticos, como materiales de origen antropógeno que son, únicamente pueden acceder al medio mediante

7.

actividades humanas y aunque en ellos se incluyen compuestos orgánicos e inorgánicos, aquí únicamente mencionaremos los primeros, entre los que se encuentran productos de la más diversa utilización, como son toda clase de materiales sintéticos (polímeros, aductos, condensantes, estabilizadores, antioxidantes, plaguicidas, tintes, detergentes, emulsionantes, resinas sintéticas, antiinflamables, drogas, gomas, - lacas).

3. BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs)

Aunque los bifenilos policlorados (PCBs) fueron descritos por primera vez en la literatura científica en 1881 por Schmidt y Schultz, la generalización del empleo industrial de estos compuestos no tuvo lugar hasta 1930 (Penning), y aún hubieron de transcurrir 36 años hasta que Jensen en 1966, los calificó como contaminantes ambientales al identificarlos como los compuestos responsables de la serie de interferencias que aparecía sistemáticamente en el análisis residual de insecticidas organoclorados por cromatografía gas-líquido.

Durante la última década se está dedicando una atención creciente al estudio de las implicaciones de este tipo de compuestos no sólo por su incidencia sobre los ecosistemas, al haberse comprobado que su presencia en diferentes seres vivos, además de ser cada vez mayor, puede ocasionar disfunciones en su biología. (Risebrough, 1968; Ander, 1969; Zitko, 1971), sino también por su influencia en la salud humana a consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados con este tipo de productos, como ocurrió en la ciudad japonesa de Yusho en 1968, donde un elevado número de personas resultaron afectadas por la ingestión de aceite de arroz contaminado con PCBs. (Katsuki, 1969; Higuchi, 1971; Tanaka, 1972).

Bajo la denominación de bifenilos policlorados se engloba a toda una serie de compuestos, cuya molécula puede - contener de una a diez clorosustituciones y que se caracteriza por su elevada estabilidad fisicoquímica. En efecto, los PCBs son químicamente inertes, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, resisten los tratamientos con ácidos, álcalis y otros agentes corrosivos, presentan una baja volatilidad, pueden ser destilados sin descomposición, inalterables a la calefacción prolongada a 150°C, eléctricamente se comportan como agentes no conductores y no mantienen la - combustión a temperaturas inferiores a 360°C, retardando la inflamabilidad de otros materiales.

Estas características permiten su empleo en diferentes ramas de la industria, y de la utilización que de ellos se - hace, merecen destacarse:

- 1) Lubrificantes en electrónica, sistemas de alto vacío o elevada presión.
- 2) Fluidos hidráulicos o de interacción térmica.
- 3) Antiestáticos y aislantes en la industria electrónica.
- 4) Antiinflamables en la industria papelera, en celulosa y tejidos.
- 5) Antihumectantes, impermeabilizantes, refrigerantes y agentes anticorrosivos.

- 6) Aditivos plastificantes y reblandecientes en la industria de los plásticos, gomas y pinturas.
- 7) Aditivos en formulaciones plaguicidas como dispersantes, estabilizadores y agentes sinérgicos del principio activo.

El amplio espectro de aplicación que presentan estos - compuestos lleva consigo el que en la práctica no se utilicen compuestos individuales sino mezclas de ellos formados por moléculas con diferente número y posición de clorosustituciones, con objeto de tratar de acentuar las cualidades positivas y - de disminuir las negativas, según el ámbito de utilización.

Los PCBs se fabrican y comercializan como mezclas de bifenilos policlorados que difieren en el porcentaje de cloración, así como en su denominación en dependencia de la firma que los fabrica: así, en EE.UU por Monsanto - bajo el nombre de Aroclor, en Francia por Prodellec (Phenoclor), en Alemania por Bayer (Clophen) y en Japón por Kaneuchi (Kaneclor). Puesto que la mayor parte de los trabajos de investigación sobre estos compuestos, se han centrado sobre el Aroclor, es oportuno utilizar el código de Monsanto - para designar sus características: el primer y segundo dígitos indican el tipo de molécula: 12, bifenilos policlorados, 54, terfenilos policlorados, mientras que los dos últimos dígitos expresan el porcentaje en peso de cloro. Así, Aroclor 1254 es un bifenilo policlorado que contiene un 54% de cloro.

4. INGRESO Y DINAMICA EN EL MEDIO AMBIENTE DE LOS PCBs

El conocimiento de los procesos de ingreso y transporte de los PCBs en el medio, aún dista mucho de ser completo. Hay pruebas que sugieren que su dinámica en los ecosistemas es semejante a la del DDT ya que, en primer lugar, presentan una serie de propiedades similares como son su análogo peso molecular, su baja solubilidad en agua y su alta estabilidad; en segundo lugar, sus ritmos de ingreso se asemejan a los del DDT (así la relación PCB/DDT total varía de 0,2 a 5 en la mayoría de los casos) y por último, ambos grupos de compuestos experimentan el fenómeno de la magnificación biológica, como han demostrado Jensen (1969) y Holden (1970) a través de estudios de campo y Keil (1971) en trabajos de laboratorio.

Ahora bien, si el transporte a lo largo del ecosistema de los PCBs puede ser comparado con el del DDT, no ocurre así con los mecanismos de entrada ya que en este último caso el ingreso es totalmente intencionado y se restringe a aquellas áreas que requieren la acción plaguicida, mientras que en el caso de los PCBs el ingreso en el medio, ni intencionado, ni localizado, sólo es debido al amplio ámbito de utilización de estos productos y al gran número de materiales en cuya composición pueden estar los PCBs. (La produc-

ción de PCBs en los EE.UU, durante la década 1961-1970 fué - de 312.000 toneladas y en el intervalo 1954-1972 en el Japón fué de 57.000 toneladas).

Con el único fin de estudiarlos, podemos considerar cinco vías de ingreso de los PCBs en el medio ambiente:

1) Por su masivo empleo a nivel industrial, no es - aventurado pensar que pueden acceder al medio terrestre y acuático, no sólo a consecuencia de los procesos de fabricación de los mismos, sino también de todos aquellos materiales de cuya composición forman parte.

2) A este tipo de contaminación, se suma la atmosférica, la cual se produce durante la combustión de materiales - de desecho en cuya composición entran los PCBs.

3) La utilización de estos compuestos como agentes mejorantes y sinérgicos de ciertos insecticidas organoclorados posibilita el acceso directo de los PCBs a los ecosistemas. Este empleo está ahora rigurosamente prohibido.

4) Parece haber sido demostrado experimentalmente - que los residuos de DDT constituyen, por efecto de la radiación solar, una nueva fuente de PCBs (Moilanen y Crosby, 1973) (Fig. 1).

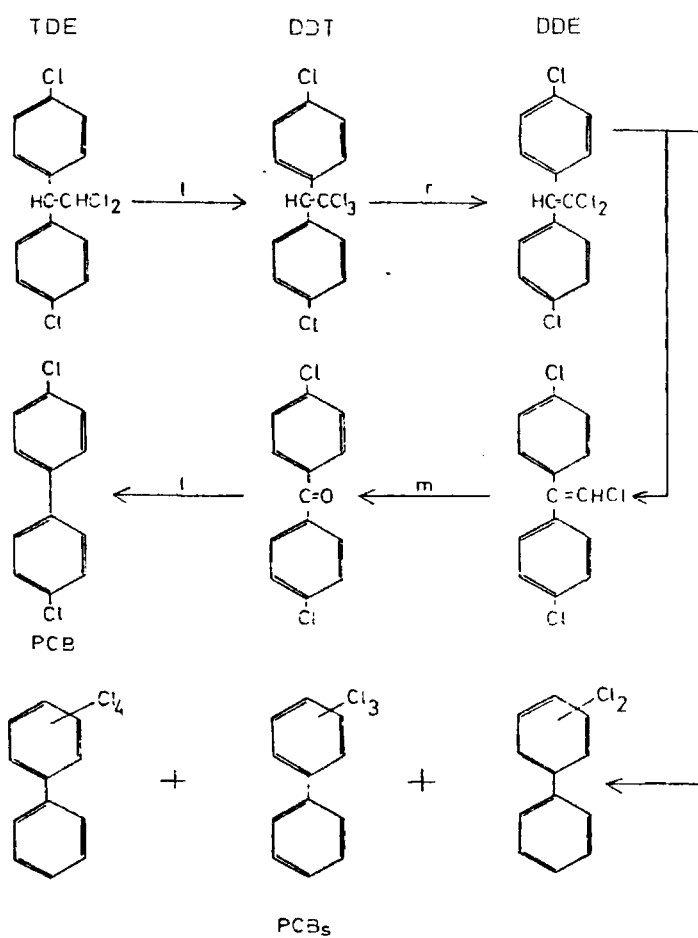


Fig. 1.- Fotoconversión del DDT en la atmósfera (Moilanen, 1973); l: lento; r: rápido
m: moderado.

5) Por último, existe la posibilidad de producirse algún tipo de reacción de Ullman, con interacciones de - haluros aromáticos, catalizadas por agentes metálicos como el cobre, y con la consiguiente formación de biarilos.

Una vez que estos compuestos xenobióticos han accedido al medio, se encuentran a merced de toda una compleja serie de mecanismos, físicos, químicos y biológicos -recogidos en la figura 2- que funcionando como efectivas vías de transporte difunden el xenobiótico sobre áreas cada vez más extensas.

La magnitud del proceso de diseminación depende en primer lugar de las particularidades topográficas, climáticas y biosféricas del área contaminada, y en segundo lugar de la estabilidad química del compuesto utilizado que, como ya se ha especificado, en el caso de los PCBs es elevada. Estos - contaminantes, al ser transportados por las corrientes de aire, agua y los organismos vivos, se difunden ampliamente, pudiendo algunos residuos permanecer en lugares poco accesibles durante largos períodos de tiempo y, aunque se encuentren en pequeña concentración, debido a su toxicidad y persistencia, están afectando a los sistemas biológicos.

La cadena de contaminación del medio por PCBs (que

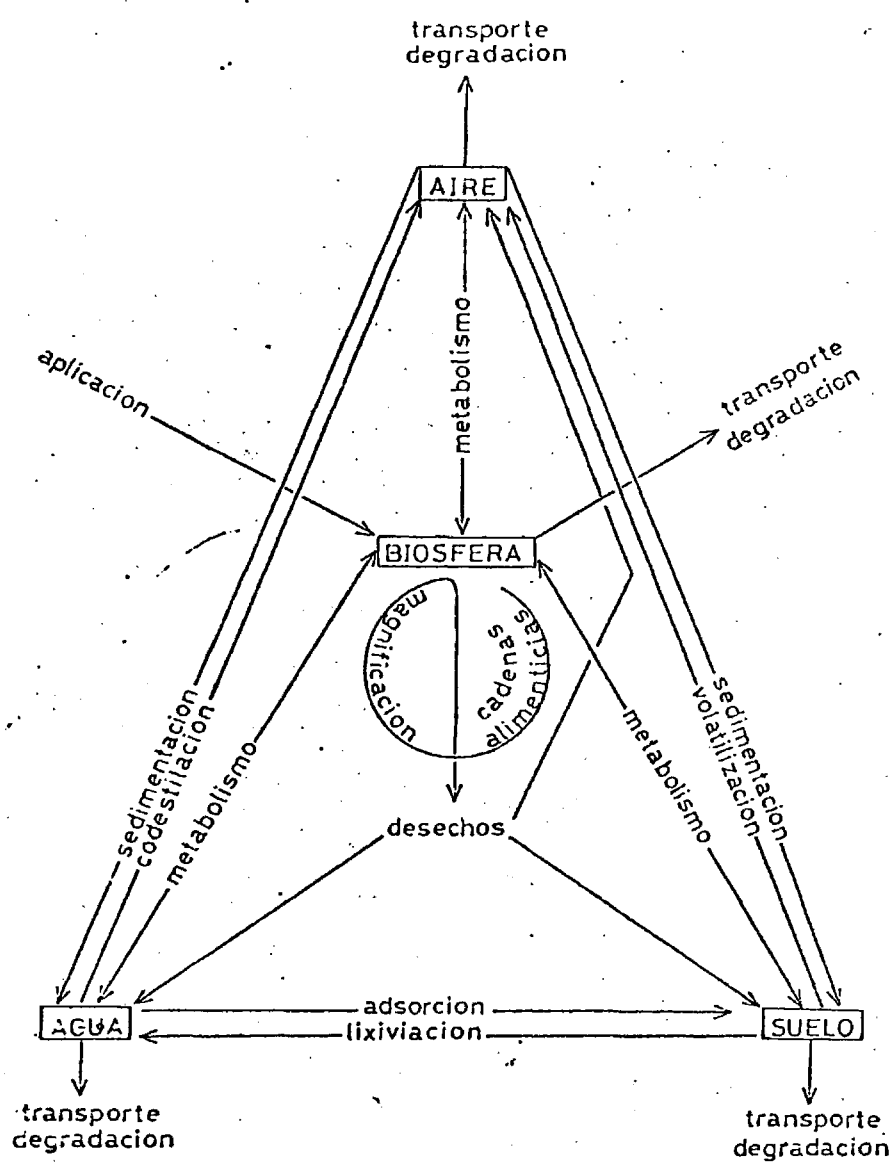


Fig. 2. Transporte de los PCBs en el medio

se esquematiza en sus eslabones fundamentales en la figura 3) es tan extensa y variada que puede llegar a límites insospechados: un suelo contaminado, al ser anegado por el agua de lluvia o de riego puede permitir su desplazamiento hacia las corrientes fluviales y de aquí a las costas y océanos. Al contaminarse las plantas acuáticas, muchas de las cuales son fuente alimenticia de la fauna piscícola, aquella se puede extender a lugares muy alejados del foco inicial de la contaminación.

Por otra parte, la variada microfauna edáfica, lleva consigo una fracción del xenobiótico que de esta forma se extiende a otras áreas no contaminadas. Las aves, que se alimentan de seres contaminados, transportan los residuos en sus movimientos migratorios a regiones que pueden estar muy alejadas del área inicialmente contaminada. Solamente a través de estas cadenas tróficas pueden repartirse extraordinariamente los PCBs, alcanzando zonas de difícil acceso directo. La muerte y descomposición de las plantas y animales contaminados devuelve al suelo y pone a disposición de los microconsumidores el contenido tóxico vehiculado en sus organismos (Baluja, 1967). Entonces, las estructuras de elevada estabilidad, como los PCBs, son susceptibles de penetrar intactos en las redes tróficas, concentrándose en las especies consumidoras de orden superior que por ser las que tienen menor tasa de renovación, reciben un impacto comparativamente mayor.

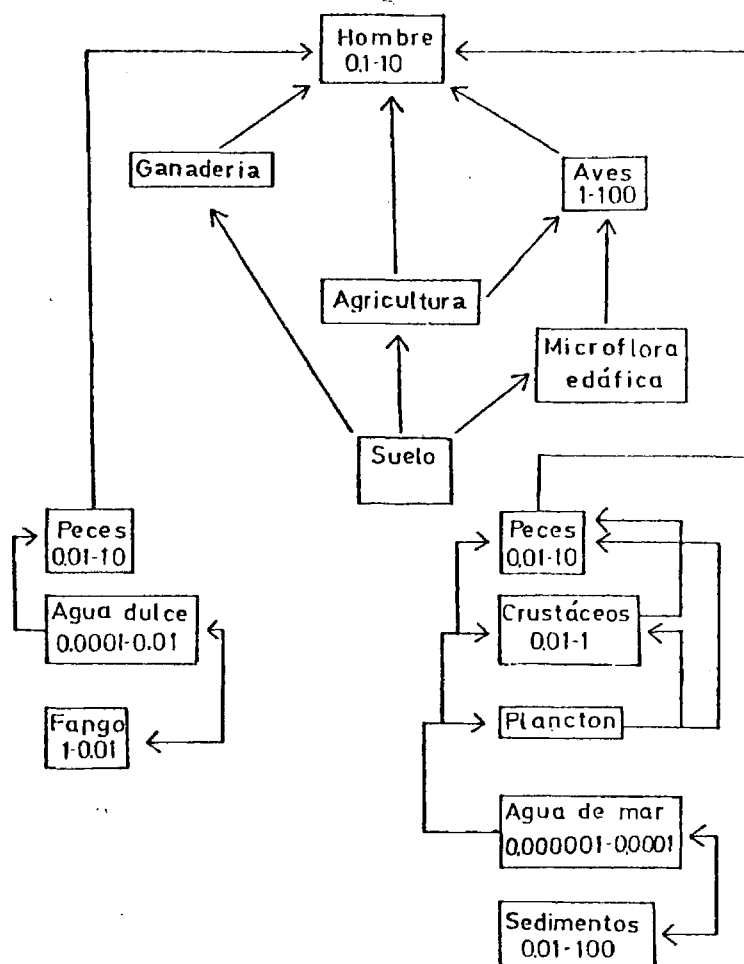


Fig. 3. Dinámica y bioconcentración de los PCBs en el medio ambiente.

5. TOXICIDAD DE LOS PCBs

La evaluación toxicológica correcta de los PCBs tropieza con la dificultad de la escasez de trabajos que proporcionan datos fiables acerca de la DL_{50} ; ello es debido fundamentalmente al hecho de que se trata de mezclas de análogos estructurales, aunque es también necesario tener en cuenta la existencia de impurezas que se forman durante los procesos de síntesis de los PCBs, como son los clorodibenzofuranos y clorodibenzodioxinas, compuestos ambos de elevada toxicidad y cuyos efectos pueden enmascarar los producidos específicamente por los PCBs.

Con el único fin de proporcionar valores indicativos acerca del orden de los niveles de PCBs que pueden incidir sobre la biología de los principales grupos de seres vivos, hay que destacar que en lo que se refiere a insectos, -- Lichtenstein (1969) ha comprobado que los PCBs son entre 40 y 300 veces menos tóxicos que el DDT para la mosca doméstica (*Musca domestica*) y para la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y que esta toxicidad decrece según aumenta el contenido en átomos de cloro. En lo que concierne a los crustáceos, Duke (1970) evaluó en 0,1 mg/l la concentración necesaria en agua para ocasionar una mortalidad del 100% en el camarón rosa (*Penaeus duorarum*) al cabo de 48

horas. En lo que hace referencia a los peces, Wildish - (1970) estimó que el umbral para el *Gammarus oceanicus* es de 0,001 a 0,01 mg/l en agua de Aroclor 1254, mientras que Hansen (1971) encontró que *Lagodon rhomboides* y *Leiostomus xanthurus* morían entre las 14 y 15 horas después de ser - expuestos a 0,005 mg/l de Aroclor 1254. Las aves consti- tuyen, sin ninguna duda, el grupo de seres vivos que ha si- do estudiado con mayor detalle, dentro del ámbito que esta- mos considerando, y así Heath et al. (1972) han estudia- do tres especies de aves (ánade silvestre, faisán y codor- niz japonesa) en presencia de seis Arocloros distintos. En general, la toxicidad aumenta conforme lo hace el porcentaje de cloro que contiene cada una de las mezclas ensayadas.

Los niveles de contaminación en tejidos de aves muer- tas, presumiblemente por envenenamiento por PCBs, han sido investigados por Presst (1970), Vos (1970) y Dahlgren (1972), los tres investigadores evaluaron los niveles en hígado, y han señalado grandes variaciones al respecto. Presst ha - encontrado valores de 70 a 692 ppm en ejemplares muertos - de *Lonchura striata* y de 3 a 639 en ejemplares vivos. Vos y Koeman han dado niveles hepáticos de 680 a 3.400 ppm en pollos muertos durante el experimento. Dahlgren consta- tó grandes variaciones en las cantidades presentes en el hí- gado de faisanes, ya que oscilaban de 390 a 9.300 ppm.

En nuestro país, las investigaciones llevadas a cabo por Baluja (1977) sobre muestras hepáticas de garza imperial (*Ardea purpurea*) y pato cuchara (*Anas clypeata*) proporcionan niveles de 0,32 ppm y 0,83 ppm para ejemplares vivos de dichas especies, mientras que en ejemplares hallados muertos (con toda probabilidad, la muerte no fué debida a envenenamiento directo por PCBs) los valores alcanzados son de 2,2 y 1,08 respectivamente.

Parece pues evidente que las concentraciones encontradas en hígado tienen una problemática relación con la toxicidad y así, los autores antes mencionados, comprobaron una mejor correlación entre los niveles encefálicos de PCBs y muerte que entre los niveles hepáticos y muerte. Vos y Koeman indicaron que valores comprendidos entre 210 y 420 ppm en el cerebro ocasionaban, en la mayoría de los casos, la muerte por intoxicación. Dahlgren sitúa estos niveles entre 300 y 400 ppm.

Pero en lo que se refiere a la avifauna, es preciso destacar la incidencia de los PCBs sobre el proceso reproductor. En efecto, estos compuestos xenobióticos, de forma análoga al dieldrín y DDE, estimulan la producción de hidroxilasas hepáticas, lo que origina una depresión en los niveles de estrógenos circulantes, que se traduce en una re-

ducción de la reserva cálcica de las aves, con la consiguiente disminución de los niveles de calcio en disposición de - pasar a formar parte de la cáscara de huevo. Así pues, la conjunción de ambos mecanismos da lugar a la deposición - tardía de huevos provistos de cáscaras anormalmente delgadas. El proceso se esquematiza en la figura 4.

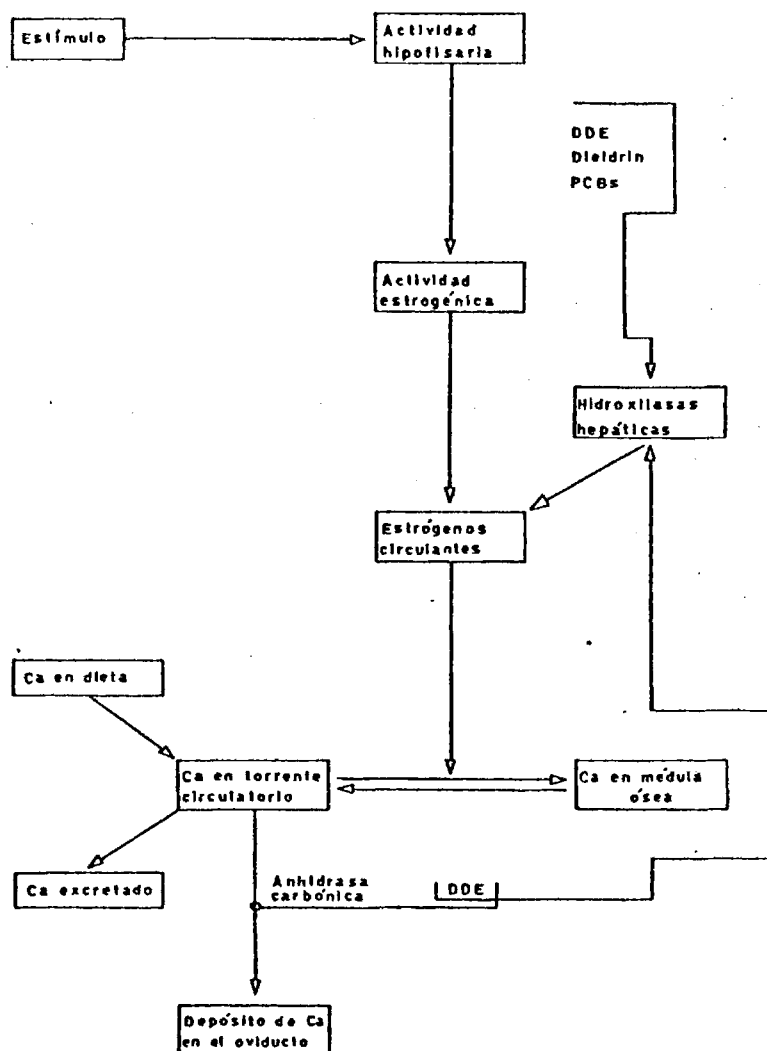


Fig. 4. Indicencia del DDE, dieldrín y PCBs sobre el metabolismo del Calcio.

6. PERSISTENCIA EN EL MEDIO DE LOS PCBs

Los mecanismos que contribuyen a la descomposición ó desactivación de los PCBs presentes en el medio y por tanto a una disminución de su persistencia los podemos clasificar en físicos, químicos y biológicos.

Entre los factores de orden físico destacan la temperatura y la radiación solar. Por lo que respecta a la primera, sus efectos son escasamente significativos ya que las descomposiciones térmicas de los PCBs tienen lugar a temperaturas y condiciones que nunca se alcanzan en la naturaleza.

En lo que atañe a la radiación solar, su papel parece ser más relevante, ya que se ha comprobado que algunos bifenilos policlorados experimentan transformaciones cuando están expuestos a la luz ultravioleta. En el apartado dedicado a transformaciones abióticas de los PCBs se especificarán con detalle algunos casos. Entre las acciones de orden químico, y por analogía con otros compuestos organoclorados, cabría citar las oxidaciones, descloraciones, isomerizaciones, etc. que por lo general necesitan condiciones energéticas para producirse, no siendo fácil que se presenten en los ambientes naturales.

Son los mecanismos de tipo biológico los que más contribuyen a las transformaciones que experimentan los PCBs en el medio ambiente, y si bien es cierto que rara vez conducen a moléculas realmente degradadas, no menos cierto es que son los procesos biológicos los que inducen un mayor número de cambios en la molécula de los PCBs y a una mayor velocidad, como corresponde a reacciones catalizadas enzimáticamente, lo que facilita posteriores ataques de otra índole.

Hay que destacar que, en general, cuando la descomposición de un xenobiótico viene determinada por mecanismos físicos, químicos o fisico-químicos, la velocidad de la misma sigue una cinética de primer orden mientras que la que corresponde a transformaciones biológicas es del tipo sigmoidal, figura 5.

En la naturaleza es difícil discernir, sin embargo, las contribuciones debidas a cada uno de los mecanismos señalados, ya que no actúan aisladamente sino en cooperación.

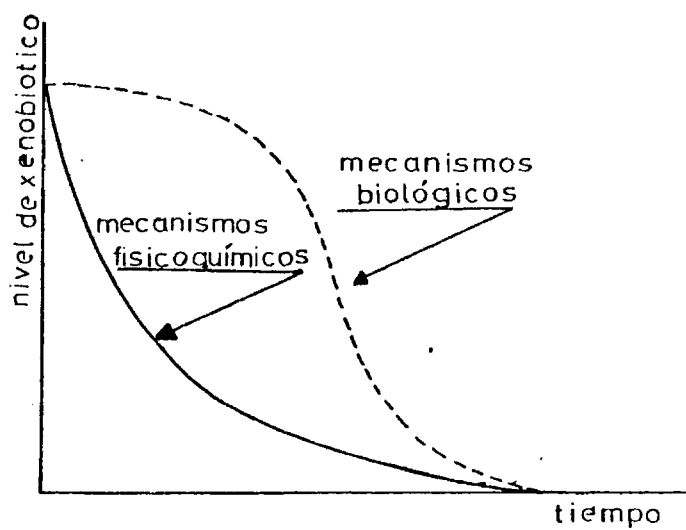


Fig. 5. Cinéticas de desaparición de un contaminante subsiguientes a una sola aplicación.

A: Por mecanismos físicos o químicos.

B: Por mecanismos biológicos (según Kearney, 1969).

7. TRANSFORMACIONES ABIOTICAS Y BIOTICAS DE LOS PCBs

Antes de acceder al estudio de las transformaciones bióticas y abióticas que los PCBs pueden experimentar en el medio ambiente es oportuno referirse brevemente a dos aspectos estructurales de la molécula de estos compuestos que condicionan sobremanera su comportamiento desde un punto de vista degradativo. El primer aspecto consiste que, en contraposición con la idea que ha predominado durante cierto tiempo, no parece que exista una estrecha correlación entre el grado de cloración de la molécula y su biodegradabilidad. En efecto, Schulte y Acker (1974), han sugerido que la resistencia de los PCBs a acciones metabólicas tendentes a -lograr -o a facilitar- la transformación de su molécula, no es función del porcentaje de cloración de la misma, sino de la carencia de al menos dos átomos de carbono adyacentes no sustituidos. Esta hipótesis ha sido parcialmente demostrada por Jensen y Sundström (1974) en animales superiores.

En la figura 6 se esquematizan las posibles localizaciones de ataque -en orden a la hidroxilación microsómica- en diferentes moléculas de bifenilos policlorados. De su observación se deduce la distinta susceptibilidad a la transformación de moléculas idénticamente cloradas según la disposición de los átomos de cloro sobre los mismos. Asimismo,

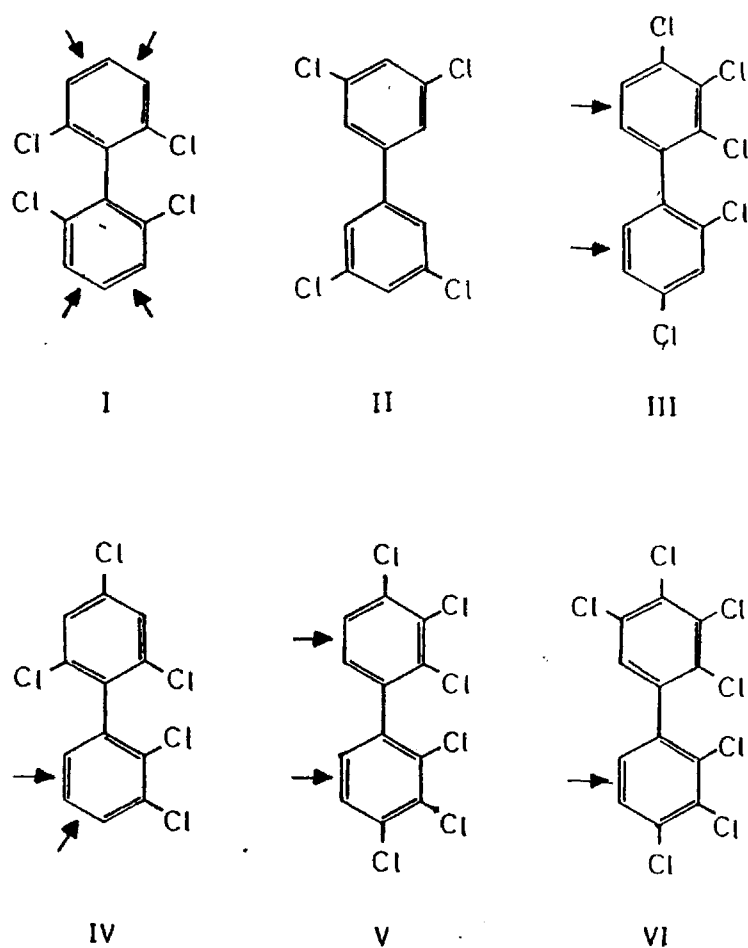


Fig. 6. Influencia del número y posición de las cloro-sustituciones en la susceptibilidad de los PCBs a la hidroxilación microsómica.

es fácil constatar que, atendiendo a este criterio, existen moléculas de menor porcentaje de cloración que son más resistentes a los procesos degradativos que aquellas que son más cloradas.

El segundo aspecto a considerar radica en la posibilidad, no desconocida en otros xenobióticos de estructura más o menos relacionada, de que el grado de coplanaridad de los dos anillos bencénicos afecte a la actividad biológica de la molécula y/o su biodegradabilidad. De nuevo, en tal caso, la posición relativa de las clorosustituciones - podría jugar un papel esencial.

En efecto, es sabido que la molécula de bifenilo es coplanar en el cristal porque al efecto de empaquetamiento se suma la tendencia a la coplanaridad por el efecto resonante, que en fase gaseosa establece un compromiso entre - esta última tendencia y las interacciones entre los hidrógenos en orto, que, más cercanos entre sí que la suma de - sus radios de Van der Waals, tenderían a producir un giro de 90° (el compromiso se resuelve en un giro de 42°).

Evidentemente la sustitución de los hidrógenos en - orto por átomos o grupos más voluminosos elevaría el grado de interferencia, por lo que, aún prescindiendo del papel -

que, en solución, jugaría la naturaleza del disolvente, es claro que en los PCBs y sus posibles metabolitos puede darse toda una amplia gradación en el ángulo interanular, con existencia de formas enantioméricas más o menos fácilmente interconvertibles (fig. 7), problemática cuya incidencia a nivel de actividad biológica no ha sido todavía investigada adecuadamente.

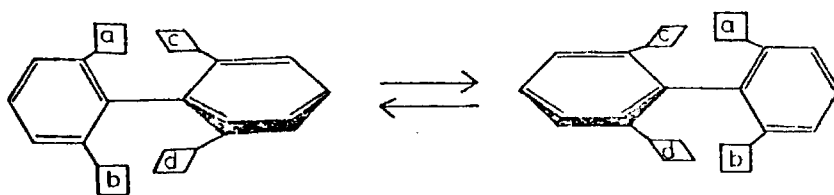


Fig. 7. Enantiomería en bifenilos sustituidos. Si los ortosustituyentes son poco voluminosos, la dificultad a la interconversión de los enantiómeros es muy pequeña y ambas formas están en equilibrio. Si son voluminosos, el paso por la coplanaridad estará impedido y no podrá tener lugar la interconversión.

Pese a la gran estabilidad química que presentan los PCBs y que ya ha sido comentada anteriormente, estos compuestos pueden sufrir toda una serie de alteraciones en su estructura por la acción de mecanismos de naturaleza física, química y biológica.

Entre las transformaciones abióticas de los PCBs, la degradación por irradiación es la más importante. Así, Hutzinger (1972) ha estudiado la descomposición fotoquímica tanto de PCBs individuales como de mezclas de los mismos, obteniendo en todos los casos productos polares oxigenados. Andersson et al. (1972) han irradiado 2,2',4,4',6,6' hexaclorobifenilo en metanol durante 30 min. a una longitud de onda de 290-430 nm, obteniendo cerca de 80 productos diferentes, siendo la mayoría de ellos derivados aromáticos clorooxigenados; entre ellos se identificaron series de o-metoxi-PCBs y de clorodibenzofuranos metoxi sustituidos. Los autores citados identificaron bifenilos de 1 a 5 átomos de cloro, siendo la descloración la principal reacción que tiene lugar.

Esta transformación físico-química de los PCBs ha sido analizada asimismo por Hustert y Korte (1974) utilizando luz ultravioleta de diferentes longitudes de onda. Así, el 2, 2',4,4',6,6' hexaclorobifenilo en disolventes

no polares sufre un desplazamiento de átomos de cloro hasta la formación de bifenilos no sustituidos, mediante un conjunto de polimerizaciones e isomerizaciones. En disolventes polares se forman compuestos oxidados, fundamentalmente hidroxilados, y muy posiblemente policlorodibenzofuranos, compuestos éstos extremadamente tóxicos, detectados como impurezas en diferentes procesos industriales. La irradiación en ausencia de disolventes da lugar a la formación de productos altamente clorados, tales como hepta y octoclorobifenilos. Parte de los compuestos que se forman por irradiación con luz ultravioleta se esquematiza en la figura 8.

Los autores citados (1974), en experimentos llevados a cabo con di, tetra y hexaclorobifenilos, tanto en estado sólido como gaseoso, han comprobado la existencia de -cloraciones, descloraciones, oxigenaciones, isomerizaciones y polimerizaciones en las moléculas de PCBs. Rappe (1973) ha constatado que, en estado de vapor, los bifenilos menos clorados son estables a la luz ultravioleta; sin embargo, en disolventes orgánicos demostró la existencia de un rápido proceso de descloración reductiva. En suspensiones acuosas tiene lugar tanto la reducción como el desplazamiento nucleófilo de Cl por OH.

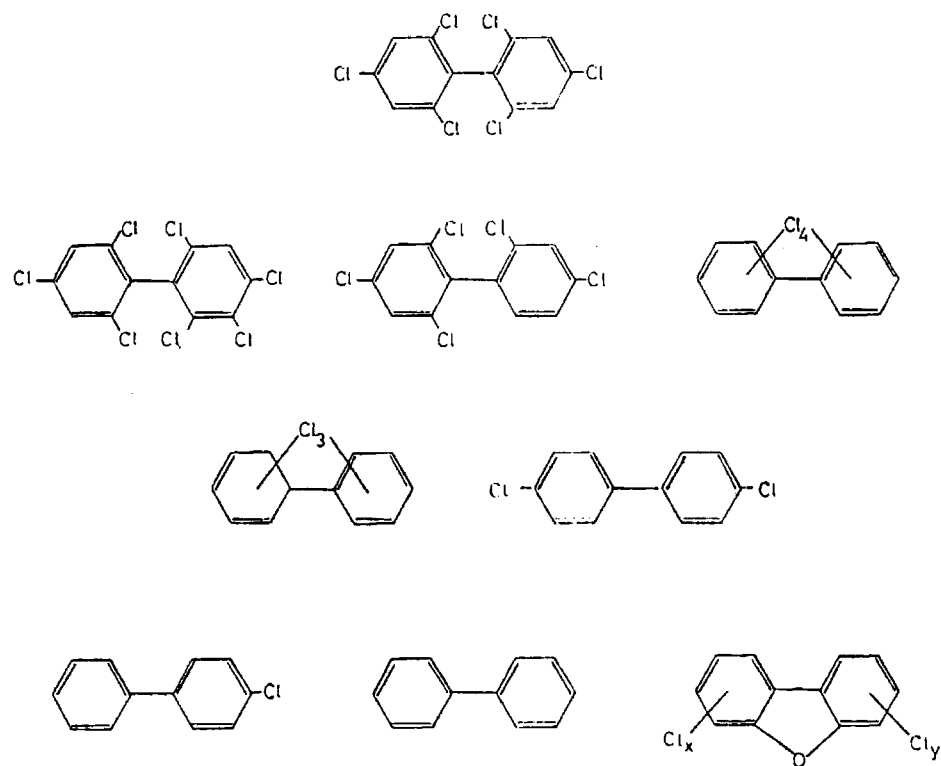


Fig. 8. Conversi3n de hexaclorobifenilo por radiaci3n ultravioleta.

Es evidente que todas las transformaciones mencionadas han sido llevadas a cabo en experiencias de laboratorio pero aún no se ha comprobado que se desarrollen en ambientes naturales. Por otra parte, la fotodescomposición experimental de los PCBs, ya sea debido a oxidaciones, reducciones, reacciones fotonucleofílicas, isomerizaciones, etc., se ha demostrado que se encuentra estrechamente relacionadas con el medio en que tienen lugar.

Antes de iniciar el estudio de las transformaciones bióticas que experimentan los PCBs, es necesario estimar la validez del concepto de degradación aplicado a estos compuestos xenobióticos, así como las consecuencias reales que comportan sus transformaciones. En realidad, en la gran mayoría de los casos, el término degradación en su sentido estricto, entendido como el proceso en virtud del cual un compuesto orgánico queda disminuído en su número de átomos de carbono, resulta incorrecto en este contexto particular, ya que ni por mecanismos de índole biótica o abiótica se suelen conseguir más que ligeras transformaciones químicas que afectan a la molécula de un modo muy restringido o localizado, y que, desde luego, no sustraen eslabones a su esqueleto carbonado.

Obviamente, puede objetarse que alteraciones muy superficiales desde un punto de vista puramente químico, conllevan cambios básicos en lo que se refiere a la actividad biológica. Ello es cierto y se conocen numerosos ejemplos reales en los que así ocurre, con el consiguiente descenso de toxicidad, pero como contrapartida, también se dan casos en los que la alteración hace aparecer propiedades indeseables: así, sin salir del ámbito de los hidrocarburos organoclorados, se sabe que el aldrín es epoxidado y convertido en dieldrín mediante el metabolismo de muchos seres vivos, resultando ser el metabolito más estable que el sustrato original, por lo que su acumulación en los seres vivos se ve de esta forma facilitada. Asimismo, el dieldrín puede a su vez experimentar una fotoisomerización inducida por la fracción ultravioleta de la radiación solar, siendo el fotoisómero más tóxico para algunos animales superiores.

En el caso de los PCBs la transformación más frecuente es aquella que da lugar a compuestos hidroxilados, aunque también se producen en muy pequeñas cantidades otros compuestos polares. En cualquier caso y aunque los estudios toxicológicos llevados a cabo con estos metabolitos son escasos, no parece que tenga lugar una disminución sensible de la toxicidad, lo que apoya la idea acerca de lo cuestio-

nable que resulta el concepto de degradación en el caso de estos compuestos xenobióticos.

Los estudios de las transformaciones metabólicas de los PCBs se han desarrollado en dos campos: uno que utiliza PCBs comerciales, constituidos por mezclas complejas -- de diversos compuestos, dado que estas mezclas son las que acceden al medio y se integran en la biosfera, y un segundo campo que emplea los componentes individuales de las -- mezclas con objeto de constatar la existencia de alteraciones producidas en la molécula, via metabolismo.

La comparación entre los perfiles cromatográficos de las mezclas-patron administradas a diferentes animales y -- las obtenidas de tejidos, órganos y excretas de dichos animales, pone de manifiesto una serie de conversiones metabólicas cuya naturaleza y velocidad depende del ser vivo considerado. Por lo general, se puede afirmar que los compuestos menos clorados de las mezclas desaparecen en mayor proporción que los de alto grado de cloración.

Así, los estudios de Grant (1971) consistentes en la administración oral de diferentes dosis de Aroclor 1254 a ratas macho, además de constatar su presencia en todos -- los tejidos analizados, preferentemente en el tejido adipo-

so, indicaron que los diferentes componentes de la mezcla eran metabolizados a diferente velocidad, siendo ésta máxima en los de menor grado de cloración. Por otra parte, los residuos detectados en cerebro, bazo, sangre, testículos, - corazón, riñón y grasa quedaron reducidos entre un 33% y un 90% al cabo de los 20 días, comprobándose un aumento - significativo del tamaño del hígado, así como el porcentaje lipídico de dicho órgano.

Los experimentos llevados a cabo por Bayley y Bunyan (1972) sobre aves, demostraron que en el hígado se daba un alto grado de transformación de los compuestos menos clorados de los Aroclor 1242 y 1254, mientras que en los extractos apenas se detectó la presencia del material administrado.

Los estudios metabólicos realizados con los compuestos individuales que integran las diferentes mezclas de bifenilos policlorados han confirmado que la hidroxilación es la reacción que se presenta casi con exclusividad, siendo - los productos mono, bi ó trihidroxilados -o sus conjugados- los que aparecen con mayor frecuencia. Así Block y Cornish (1959) han comprobado que el 4-clorobifenilo era transformado en el 4-cloro-4'-hidroxibifenilo y sus conjugados correspondientes en el caso de los conejos. Las alteraciones metabólicas del 4-clorobifenilo, 4-4'-diclorobifenilo, 2,2',5,5'-

tetraclorobifenilo y 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo han sido estudiados por Hutzinger et al. (1972) en palomas, ratas y truchas. Los resultados mostraron la conversión del 4-cloro, 4,4'-dicloro y 2,2',5,5'-tetraclorobifenilos en sus hidroxiderivados, tanto en rata como en paloma, mientras que no se detectó ningún metabolito en las excretas de la trucha. Sin embargo, el 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo no se transformaba en su hidroxiderivado en ninguno de las tres especies objeto de experimentación (fig. 9).

Goto et al. (1974^a, 1974^b) estudiaron el metabolismo en ratas de compuestos que contenían todos los átomos de cloro en un anillo, quedando el otro anillo en disposición de ser hidroxilado. Concretamente los compuestos ensayados fueron el 2,3-diclorobifenilo, que se hidroxila en la posición 4', el 2,4,6-tetraclorobifenilo que da lugar al 4'-hidroxiderivado, 3',4'-dihidroxiderivado y el 3',4'-hidroxi-metoxi-derivado, el 2,3,5,6-tetraclorobifenilo y el 2,3,4,5,6-pentaclorobifenilo se transformaron en los 3' y 4'-monohidroxiderivados, 3',4'-dihidroxiderivados y 3',4', hidroximetoxiderivados.

Comparemos ahora las diferentes transformaciones a las que se encuentra sometido un único compuesto integrante de las mezclas de PCBs, en dependencia de los seres vivos -

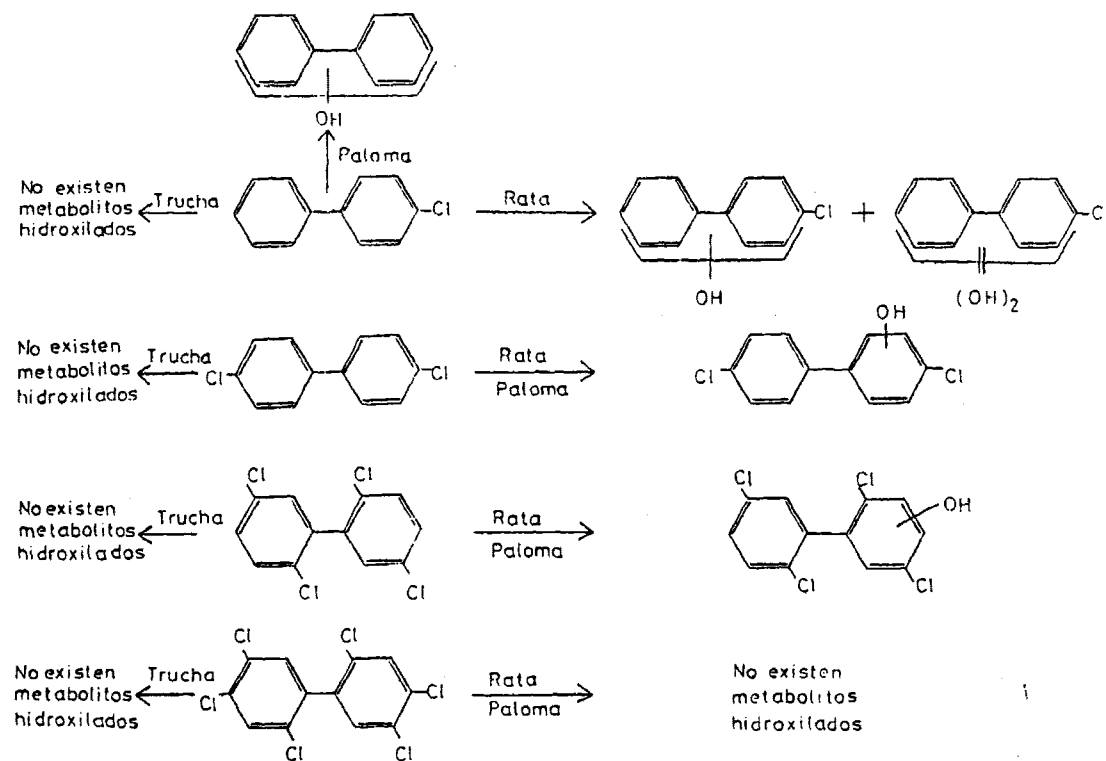


Fig. 9. Metabolismo comparativo de diferentes PCBs

objeto de experimentación. El compuesto seleccionado ha sido el 2,2'-diclorobifenilo no sólo por formar parte de prácticamente la totalidad de todas las mezclas conocidas de PCBs, sino por ser el más estudiado en los trabajos de índole metabólica llevados a cabo con bifenilos policlorados.

En primer lugar, este compuesto no es metabolizado por una serie de microorganismos ensayados (Muller, 1974, 1974^a, 1974^b), a excepción hecha de *Nocardia* sp que es capaz de crecer en presencia de 2,2'-diclorobifenilo, compuesto que utiliza como fuente de carbono, y que se transforma en una proporción del 4% en un metabolito de naturaleza desconocida, pero este tema se tratará con más detalle en el capítulo 8. Los ensayos llevados a cabo con vegetales han demostrado la existencia de una serie de transformaciones del compuesto utilizado. Así, la *Veronica beccabunga* origina un conjunto de metabolitos altamente hidrofílicos; sometidos a hidrólisis ácida se detectan dos monohidroxiderivados del 2,2'-diclorobifenilo, uno de los cuales era detectado también en estado libre, aunque en muy bajas proporciones (fig. 10).

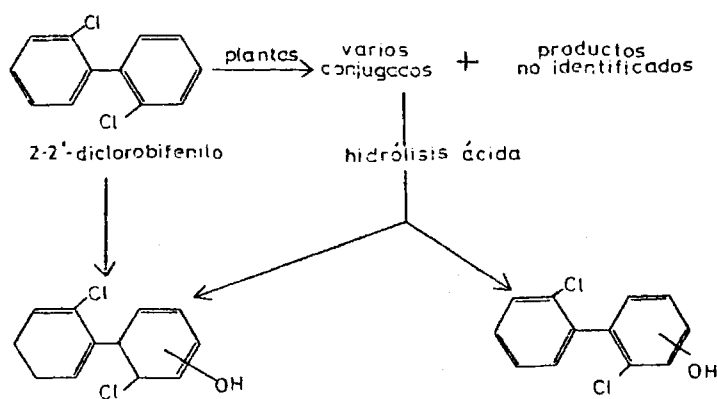


Fig. 10. Metabolismo del 2,2'-diclorobifenilo en *Veronica beccabunga*.

Los experimentos efectuados con especies de los géneros *Ranunculus* y *Callitrichi* permiten constatar la presencia de un conjunto de conjugados que por hidrólisis rendían dos isómeros de un monohidroxiderivado de 2,2'-diclorobifenilo (fig. 11).

Las experiencias de laboratorio realizados por Hutzinger (1972^a) sobre pez dorado, demostraron que se producían dos monohidroxiderivados, mientras que en experiencias efectuadas con truchas bajo condiciones ambientales comprobó que el 2,2'- era metabolizado en muy baja proporción, -

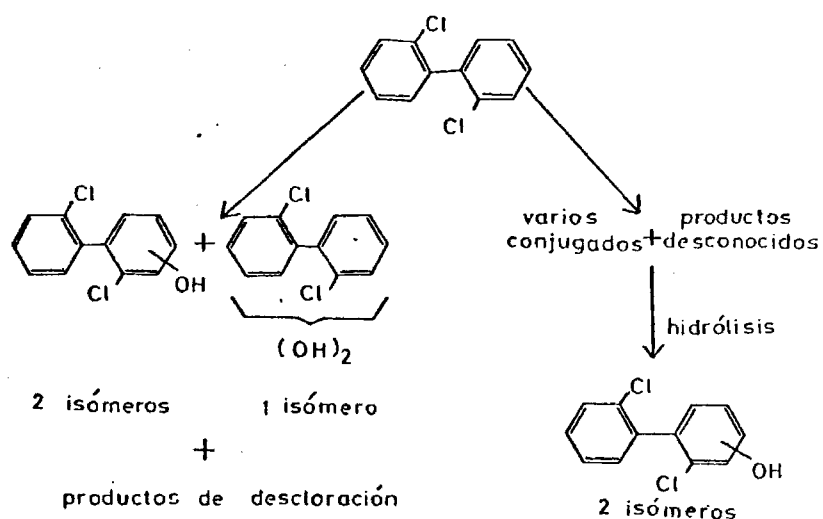


Fig. 11. Metabolismo de 2,2'-diclorobifenilo en Ranúnculos.

lo que sugiere la dificultad de extrapolar las conclusiones a nivel de laboratorio al ámbito natural.

Kamal (1976), ha detectado, en las heces de las ratas dosificadas con 2,2'-diclorobifenilo, dos monohidroxi, tres dihidroxi y un trihidroxi derivados, así como una pequeña cantidad del compuesto sin transformar y una menor -

fracción de compuestos conjugados. Por otra parte, Greb (1976) ha incubado 2,2'-diclorobifenilo en presencia de la fracción microsomal de un homogenato hepático de rata durante una hora a 37°C y detectó los cuatro isómeros mono hidroxilados teóricamente posibles.

Cabe inferir de todo este conjunto de investigaciones que aún cuando las transformaciones que pueden experimentar los bifenilos policlorados por parte de diferentes seres vivos, quedan prácticamente reducidas a hidroxilaciones en diferentes posiciones de los anillos, la cuantía - numérica de las mismas aumenta cuanto más evolucionado es el ser vivo considerado.

8. INTERACCIONES ENTRE MICROORGANISMOS Y PCBs

Obviando por el momento el hecho de la multiplicidad y diversificación de las formas vivas, es un fenómeno evolutivamente constatado que los organismos se adecuan metabólicamente al ambiente en que viven, presentando una morfología, una fisiología y un comportamiento que han sido perfectamente diseñados en orden a capacitar a cada ser vivo a fin de que se adapte al mundo que le rodea y pueda subsistir en él. El punto de vista actual sobre la adaptación es que el ambiente plantea ciertos "problemas" que los organismos necesitan "resolver" y que la evolución a través de la selección natural constituye el mecanismo para crear dichas soluciones. La adaptación es el proceso de cambio evolutivo mediante el cual el organismo procura una "solución" al problema cada vez más perfecto, siendo el resultado final la adecuación al medio.

En el caso de los microorganismos, la adaptación se manifiesta mediante un retraso en el comienzo del crecimiento durante la fase de latencia. Como ya se ha comentado en el capítulo 2, la adaptación de los microorganismos puede ser genotípica o fenotípica, y así, en el caso de cultivos experimentales, la adaptación genética resulta de la selec-

ción de los organismos del inóculo que son capaces de reproducirse en el ambiente en cuestión. Cuando una población se encuentra en un medio al que no está habituada, el equilibrio que normalmente se establece entre mutación, por una parte, y retromutación y acción de los mecanismos selectivos, por otra, se desplaza en el sentido de favorecer la primera, con lo que los mutantes se convierten en los miembros dominantes de la población.

En el caso de las adaptaciones no genéticas, estos no implican transformaciones de ningún tipo en el patrimonio hereditario de los microorganismos, sino que cada ser vivo, de forma individual, adquiere capacidad para desarrollarse en un determinado ambiente, por ejemplo: sintetizando una enzima inducible que sea necesaria para el metabolismo de un nutriente presente en el medio ambiente.

De lo anteriormente expuesto cabe deducir que la acción microbiana debería degradar, en gran parte al menos, un buen número de compuestos xenobióticos. Sin embargo, en el caso que nos ocupa la notable estabilidad de los PCBs hace que estas estructuras puedan permanecer en el medio durante períodos considerables de tiempo.

Por otra parte, y dado que no siempre las transfor-

maciones metabólicas conducen a compuestos menos tóxicos, - se puede considerar que un proceso es realmente destoxificante cuando:

1) El metabolito sea menos tóxico intrínsecamente en su lugar de acción.

2) El metabolito sea menos tóxico por su peor distribución o por su menor tiempo de residencia en el lugar de acción.

Una cuestión de interés dentro del ámbito del metabolismo de compuestos xenobióticos radica en la extensión y significado de dicho metabolismo por parte de los microorganismos. De inmediato se plantea la cuestión de por qué los microorganismos son capaces de obtener energía de la degradación de los xenobióticos presentes en el medio, generalmente en muy bajas concentraciones, mientras que hay otros nutrientes en el suelo. Parece que la respuesta -en el caso de los PCBs- radica en el carácter lipófilo de - estos compuestos organoclorados, ya que en medios acuosos, tales como mezclas de suelo y agua, los PCBs se asocian a la materia orgánica, donde se desarrollan los microorganismos, facultando su entrada cuando estos seres vivos toman los nutrientes por mecanismos de transporte activo y pasivo.

Desde un punto de vista generalizado, el xenobiótico incorporado por el microorganismo puede seguir dos procesos perfectamente diferenciados, uno que supone la simple acumulación del compuesto, sin que exista transformación alguna y un segundo que implica la transformación química del mismo y que a su vez puede tener lugar mediante dos mecanismos diferentes:

1) La transformación no supone un aporte energético para el microorganismo, fenómeno éste que ha sido denominado de distintas formas, y así Foster (1962), lo designa como cooxidación, Jensen (1963) como cometabolismo y Ruiz-Herrera y Starky (1968) como codesasimilación.

2) La transformación lleva consigo un aporte energético al ingresar el xenobiótico en la vía catabólica.

En el caso que nos ocupa, parece que la mera acumulación de los PCBs y su transformación sin producción de energía son los dos factores que mejor definen la dinámica en el medio de estos compuestos.

La biodegradabilidad, o susceptibilidad de un compuesto orgánico a la degradación biológica, por parte de los microorganismos es una de las primeras pruebas que se

llevan a cabo con objeto de determinar su incidencia en el medio ambiente. Las investigaciones llevadas a cabo con residuos de PCBs sugieren que estos compuestos ofrecen una elevada resistencia a la degradación microbiana, aunque en orden a evaluar de forma correcta su persistencia, es necesario no olvidar que los PCBs no están constituidos por una única especie química, sino que son una mezcla de diferentes sustancias susceptibles de ser biodegradados a diferentes velocidades.

El conocimiento de las interacciones entre los PCBs y la microflora es aún escaso. A pesar de ello, Keil et al. (1972) ha comprobado que estos compuestos estimulan el crecimiento de *Escherichia coli*. Veight (1970) ha observado que la concentración de Aroclor 1242 en aguas lacustres disminuía a mayor velocidad que la de Aroclor 1260, por lo que concluyó que este último era más resistente a la degradación microbiana que aquél. Por otra parte, Ahmed y Focht (1973) en estudios manométricos llevados a cabo con especies del género *Achromobacter* han constatado que, con excepción del 2,5,3',4'-tetraclorobifenilo, todos los PCBs ensayados eran oxidados por la bacteria. Los datos manométricos indican que 2,3-diclorobifenilo; 2,4-diclorobifenilo; 3,4-diclorobifenilo y 3,5-diclorobifenilo eran -

fuertemente oxidados por *Achromobacter*, mientras que 3,4,2'-triclorobifenilo; 2,3,2',3'-tetraclorobifenilo y 2,3,4,5,6-pentaclorobifenilo lo eran levemente. El alto grado de oxidación de los bifenilos diclorados en los que uno de los anillos permanece instituído, es debido a la degradación preferencial de dicho anillo. Asimismo, Carey y Harney (1978) estudiaron la degradación del 2,5,2'-triclorobifenilo, comprobando que era transformado por bacterias marinas aerobias en la correspondiente lactona. Sin embargo, Fries (1972) no detectó variación alguna en la composición del Aroclor 1254 acumulado en sedimentos anóxicos. De esta forma, parece ser que los PCBs pueden permanecer en ambientes anaerobios sin sufrir alteración química o biológica alguna.

Por último, Wong y Kaiser (1975) constataron que cinco especies del género *Achromobacter* y dos del género *Pseudomonas* utilizaban los Arocloros 1221 y 1242 como única fuente carbonada y energética, mientras que no sucedía tal con el Aroclor 1254. La mezcla integrante del 1221 era totalmente degradada en diferentes componentes de peso molecular inferior, al cabo de un mes de incubación.

Todos los resultados ponen de manifiesto que a pesar

de la resistencia que presentan los PCBs a ser transformados, los microorganismos constituyen el conjunto de los seres vivos que contribuyen con mayor intensidad y variedad a los procesos degradativos de los PCBs.

9. ALCANCE Y JUSTIFICACION DEL PRESENTE TRABAJO

A la luz de las consideraciones precedentes parece - evidente la importancia que durante los últimos años han adquirido los estudios tendentes a discernir las implicaciones a nivel ecológico de compuestos que, como los PCBs, tienen una indudable repercusión ambiental. Desde este punto de - vista, el estudio de las interacciones entre los PCBs y los microorganismos de naturaleza fúngica, ofrece un interés inmediato como contribución al conocimiento de los efectos debidos a un tipo de contaminación tan ampliamente difundida como la ocasionada por este tipo de compuestos.

La observación de la bibliografía aparecida en los - últimos años en torno al tema que nos ocupa, pone de manifiesto una marcada tendencia a enfatizar el estudio que sobre los compuestos xenobióticos ejercen los diferentes organismos ensayados. Sin embargo, son escasos los trabajos que aportan datos a fin de comprender el problema fundamental de los mecanismos de respuesta que ponen en juego los sistemas biológicos frente a la presencia de compuestos xenobióticos. Entre los mecanismos que contribuyen a la degradación y desactivación de los compuestos xenobióticos, los de índole - bioquímica, son los más interesantes y los que contribuyen

de forma más significativa a la transformación de los mismos, debido a ello, parece claro el interés de los estudios en torno a los procesos metabólicos, en los que se encuentran implicados dichos compuestos.

Los microorganismos edáficos constituyen un conjunto de seres vivos especialmente indicados para la realización de este tipo de estudios, dado el importante papel que desempeñan en los procesos de degradación de diferentes hidrocarburos, consecuencia de su alta capacidad transformadora de distintos sustratos, entre ellos los hongos ofrecen un interés adicional debido a su escasa permeabilidad que es mucho menor que la de cualquier otra forma microbiana del suelo.

Parece evidente, pues, que el estudio de las interacciones entre xenobióticos y hongos edáficos, ofrece un especial interés, tanto desde el punto de vista de las posibles transformaciones que experimentan aquellos compuestos, como las repercusiones que pueden tener sobre los microorganismos mismos.

A tal fin, para la realización de este trabajo se eligió la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que si bien no debe considerarse como un microorganismo típico del suelo en

sentido estricto, no se encuentra excesivamente alejado de otras levaduras que, siendolo, no ofrecen la ventaja que en *Saccharomyces cerevisiae* representa el hecho de disponer de diferentes cepas, que varían en su capacidad para degradar sustratos fermentables y no fermentables en orden a la obtención de energía. Por otra parte, resulta evidente la importancia económica de este ascomiceto.

La selección del contaminante a ensayar -o mejor la familia de contaminantes- ha quedado suficientemente justificada en la introducción de esta Memoria y solo cabe decir aquí que la expansión tanto en su producción a nivel mundial como en su detección en los análisis residuales de sustratos biológicos, hace que los PCBs sean los compuestos organoclorados que más riesgos plantean a nivel ambiental.

A la luz de lo expuesto se plantean los siguientes - objetivos:

Estudio de las transformaciones acaecidas en los PCBs imputables a la acción del microorganismo.

Estudio de la incidencia de los PCBs sobre el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*, haciendo hincapié en el

proceso de acumulación del xenobiótico y en los mecanismos que lo gobiernan.

Estudio de la fracción lipídica de la levadura, con especial atención, en lo que concierne a la subfracción saponificable, a la incidencia de los PCBs sobre los ácidos grasos y en lo que compete a la subfracción insaponificable a las implicaciones de dichos xenobióticos sobre los esteroides del ascomiceto.

Estudio de actividades enzimáticas del metabolismo de *S. cerevisiae* de especial significación por su relación con la cadena de transporte electrónico.

Juzgamos que los objetivos propuestos, además de su interés intrínseco, ofrece otro adicional, que es la novedad del mismo ya que en la bibliografía consultada, se han encontrado muy escasas referencias que estudien las interacciones entre PCBs y *S. cerevisiae*, si bien existen investigaciones en torno a la acción de estos contaminantes sobre otros microorganismos (Tejedor, 1977) o de otros xenobióticos (Pacheka, 1971) (Singh, 1977), que han abierto un camino a seguir en torno a los aspectos bioquímicos estudiados en esta Memoria.

II. MATERIALES Y METODOLOGIA

1. TECNICAS DE CULTIVO

Se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (variedad ellipsoideus), de poder fermentativo medio, designada como G-442, según el código del Instituto de Fermentaciones Industriales.

El cultivo de la levadura se llevó a cabo en dos tipos de medio:

<u>Medio fermentable</u>	<u>Medio no fermentable</u>
Extracto de levaduras .. 10 g	Extracto de levaduras .. 10 g
NaCl 0,5 "	NaCl 0,5 "
HgCl ₂ .6H ₂ O 0,7 "	HgCl ₂ .6H ₂ O 0,7 "
(NH ₄) ₂ .SO ₄ 1,2 "	(NH ₄) ₂ .SO ₄ 1,2 "
CaCl ₂ 0,1 "	CaCl ₂ 0,1 "
KPO ₄ H ₂ 1 "	KPO ₄ H ₂ 1 "
FeCl ₃ 0,005 "	FeCl ₃ 0,005 "
Glucosa 10 "	Etanol 25,3 ml
H ₂ O destilada 1000 ml	H ₂ O destilada 1000 ml

La esterilización se efectúa en autoclave a 1 atmósfera (121°C) durante 15 minutos.

Para los cultivos en medio líquido se utilizaron matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de la solución. El inóculo consiste en 0,2 ml de una suspensión de células en agua destilada estéril con un 0,1% de Tween-20. La concentración del inóculo se ajusta por dilución, llevándose a cabo el conteo de las células en una cámara hematocitométrica.

La incubación se prolonga a lo largo de períodos diferentes que oscilan entre las 14 y las 48 horas en medio fermentable y entre las 22 y las 140 horas en medio no fermentable, a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Los cultivos en medio líquido se mantienen en agitación constante (80 ciclos/min) a fin de facilitar la aireación.

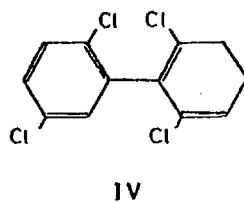
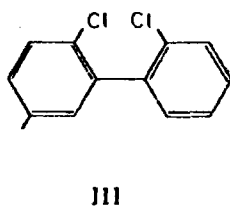
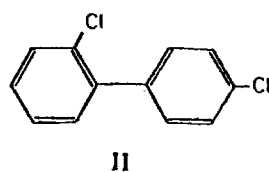
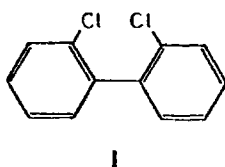
2. INCORPORACION DE LOS PCBs A LOS MEDIOS DE CULTIVO

La muy baja solubilidad de los PCBs en agua, dificulta su incorporación a los medios de cultivo con la necesaria homogeneidad. Debido a ello, y pese a que algunos autores prefieren no utilizar disolventes ni emulsificantes en este tipo de experiencias, hubo que recurrir al empleo de los primeros para la adición de los PCBs a medios acuosos con objeto de conseguir un adecuado grado de homogeneidad.

Así, para la incorporación de los PCBs a medios líquidos, se utilizó una solución en acetona, a la concentración conveniente, de la cual se añade, en condiciones asépticas, un volumen equivalente al 0,4% del volumen del medio, después de su esterilización pero antes de proceder a su siembra. Un volumen igual de acetona pura se añade asimismo a todos los cultivos control.

Se ensayaron mezclas de PCBs comercializadas bajo las denominaciones de Aroclor, (A-1232, A-1242, A-1248, A-1254 y A-1260) por la firma Monsanto. Asimismo, se utilizaron de forma individual los siguientes compuestos, integrantes, por otra parte, de las mezclas mencionadas: 2,2'-diclorobifenilo (I), 2,4'-diclorobifenilo (II), --

2,5,2'-triclorobifenilo (III), el 2,5,2',5'-tetraclorobifenilo (IV). La ausencia en estos preparados de impurezas de elevada toxicidad (policlorodibenzofuranos y policlorodibenzodioxinas) (Vos y Koeman, 1970) obvia el problema de los efectos tóxicos aditivos.



Las concentraciones a las que se opera son de 5, 10, 25 y 50 ppm de cada uno de los Arocloros y de bifenilos policlorados individuales.

3. EXTRACCION DE LOS PCBs

Una vez finalizado el período de incubación, se procede a la centrifugación de los cultivos a 1.000 g durante 30 min, con el fin de separar el medio y la biomasa.

Los medios de cultivo se extraen con 50 ml de hexano, 50 ml de éter etílico y 50 ml de hexano sucesivamente. Reunidos los extractos, se secan sobre SO_4Na_2 anhidro durante 30 seg y se concentran a temperatura ambiente hasta un volumen conveniente.

La biomasa se deseca sobre P_2O_5 a presión ligeramente reducida y se determina su peso seco. A continuación se homogeniza en mortero, utilizando como abrasivo arena de cuarzo calcinada y lavada a los ácidos, hasta obtener un polvo fino y seco.

Los homogenatos obtenidos se someten a distintas técnicas de extracción según la volatilidad de los compuestos implicados. Así, los homogenatos que contienen 2,2'-diclorobifenilo, 2,5'-diclorobifenilo, 2,2',5'-triclorobifenilo, 2,2',5,5'-tetraclorobifenilo y las mezclas de PCBs de bajo grado de cloración (A-1232, A-1242 y A-1248) no se recuperan en su totalidad si son sometidos a un proceso de extrac-

ción en caliente en aparato Soxhlet; con objeto de resolver el problema, estos homogenatos se depositan en una columna de vidrio de 2 cm. de diámetro con fondo de placa filtrante y se eluye el sistema con una mezcla de disolventes hexano:éter (75:25) hasta extraer de forma exhaustiva los PCBs contenidos en estos homogenatos.

Las mezclas de A-1254 y A-1260, se extraen en un aparato Soxhlet con 100 ml de una mezcla de acetona:hexano (60:40) durante seis horas.

En todos los casos, los extractos se desecan y concentran según se ha descrito para los obtenidos a partir de los medios de cultivo.

4. PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS

Los extractos obtenidos mediante las técnicas descritas, requieren la eliminación de una serie de sustancias, - generalmente de naturaleza lipídica o terpenoide, correspondientes a diversos productos del metabolismo fúngico, acumulados en las células y en el medio durante el período de incubación. Estas sustancias se incorporan al disolvente utilizado en la extracción y no deben introducirse en las columnas cromatográficas porque disturban el proceso de elución, estropeando rápidamente dichas columnas y al pasar al detector producen fuertes interferencias en la respuesta de éste a los PCBs que se pretenden detectar y cuantificar.

Cuando el contenido de las muestras en lípidos es elevado, el primer paso en el proceso de purificación consiste en la aplicación de técnicas de reparto entre disolventes inmiscibles. En nuestro caso se han ensayado dos - sistemas de disolventes: hexano-dimetilformamida, que fué descrito por De Faubert Maunder (1964) para la extracción de insecticidas organoclorados y hexano-acetonitrilo descrito por Onley y Mills (1962) con un fin análogo, pero con este último se han obtenido extractos más limpios y mejores resultados en la detección y cuantificación de los -

PCBs.

Sin embargo, en la mayoría de las muestras estudiadas, la pequeña proporción de impurezas presentes en los extractos, nos ha permitido prescindir generalmente de los métodos de reparto, por lo que se han utilizado técnicas basadas en la cromatografía de adsorción, como se describe a continuación.

Una columna de vidrio de 2 cm de diámetro interno se rellena hasta una altura de 10 cm con Florisil (un silicato magnésico sintético) de 60-100 mallas, previamente activado por calentamiento a 650°C durante dos horas y conservado a 130°C, cuidando que el empaquetamiento resulte apretado y homogéneo. Sobre el adsorbente se deposita una capa de sulfato sódico anhidro de 2 cm de espesor, con objeto de asegurar la carencia de agua del extracto que se va a purificar.

El extracto se añade cuantitativamente a la columna en un volumen que no debe sobrepasar los 10 ml y el sistema se eluye lentamente con 200 ml de hexano. El eluato recogido se lleva a un volumen conveniente en un evaporador Kuderna-Danish con lo que quedan los extractos concentrados en disposición de ser analizados por cromatografía gas-líquido.

A fin de minimizar las interferencias cromatográficas, todos los disolventes que se utilizan han de presentar un elevado grado de pureza, por lo que se someten a los tratamientos convenientes para asegurar unos disolventes - sin respuesta alguna en el detector de captura electrónica.

El n-hexano se purifica por redestilación sobre virutas de sodio recién cortadas, recogién^dose la fracción - que destila a 69°C (760 mm).

El éter etílico, de calidad comercial, se seca durante diez días sobre cloruro cálcico, a continuación se trata con sodio en filamentos durante otros dos días y finalmente se destila sobre virutas de sodio recién cortadas, recogien^dose la fracción que pasa a 33°C (760 mm).

5. DETERMINACION DE PCBs POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

Se han utilizado dos tipos de cromatógrafo de la casa Perkin-Elmer, el modelo F-11 y el 3920, ambos con detector de captura electrónica provisto de electrodo concéntrico y fuente de radiación de Ni^{63} . Operando en condiciones óptimas de temperatura, voltaje y caudal de gas portador (N), permite la detección y cuantificación sin error significativo de cantidades de muestra del orden de 10^{-12} g.

Se utilizaron columnas espirales de vidrio Pyrex, de 2 m de longitud y 3 mm de diámetro interno.

La composición de las fases estacionarias empleadas, así como los parámetros operatorios, se esquematizan en la Tabla I.

La columna designada como (I), rellena con un bajo porcentaje de una fase de escasa polaridad, resuelve de forma adecuada y con tiempos de retención óptimos las señales correspondientes a los distintos compuestos que integran las mezclas de PCBs.

La columna II, rellena con un porcentaje de carga superior y conteniendo una apreciable proporción de la fluor

T A B L A I

Fases estacionarias y parámetros operatorios utilizados en el análisis por C.G.L.

<u>Fase estacionaria % sobre soporte</u>	<u>Soporte</u>	<u>Temperaturas C. D. I.</u>	<u>Caudal (N₂)</u>
E-301 (1,2%) (I)	Chromosorb W-HP 80-100 mallas	160 180 200	40 ml/min
DC-200 (5%) QF-1 (7,5%) (II)	Chromosorb W-HP 80-100 mallas	200 210 220	60 ml/min

silicona QF-1 (fase de mayor polaridad), resulta de una eficacia muy superior a la I y se utiliza para la resolución de extractos de PCBs y los posibles metabolitos presentes.

Ninguno de los productos implicados en los análisis cromatográficos ofrece problemas de termolabilidad a las temperaturas de trabajo utilizadas.

6. CUANTIFICACION DE PCBs

Los extractos problema, concentrados y puros, se inyectan alternadamente con los patrones -soluciones estandar de concentración conocida-, realizándose la identificación sobre la base de los tiempos de retención.

La determinación cuantitativa se lleva a cabo por - comparación entre las áreas de las señales problema y las de los patrones de concentración conocida procurando siempre la consecución de picos de magnitud similar a fin de - operar dentro de los márgenes de respuesta y de linealidad del detector previamente comprobados.

El grado de conservación de la composición de una - mezcla de PCBs después de cada ensayo microbiológico, se - evalúa a través del criterio del perfil cromatográfico. Tal variación se estima cuantitativamente determinando, en los cromatogramas de soluciones estandar, las relaciones entre las superficies de todas las señales frente a una prefijada y comparándolas con las relaciones homólogas calculadas sobre un cromatograma problema obtenido en idénticas condiciones. Dentro de dos cromatogramas correspondientes a diferentes inyecciones de la misma solución estandar, los co-

cientes de las relaciones homólogas se mantienen sensiblemente constantes alrededor de la unidad ($\pm 0,03$) cuando la magnitud de las deflexiones se mantienen entre el 40 y el 60% de la escala de registro.

Comprobada la conservación del perfil cromatográfico, para la cuantificación se considera como superficie significativa la correspondiente a la suma de las cinco señales - más relevantes del cromatograma en el caso de los Arocloros, y del pico unitario en el de los bifenilos policlorados individuales.

Los índices de recuperabilidad obtenidos a lo largo del proceso incluídas las operaciones cromatográficas, dan por resultado una media del 95%, lo que da idea de la bondad de la metodología utilizada.

7. ESTUDIO DE LA FRACCION LIPIDICA

7.1. EXTRACCION Y PURIFICACION DE LIPIDOS

El homogenato de células obtenido se somete a los correspondientes procesos de extracción. Se han ensayado varios métodos consistentes en la extracción con mezclas de etanol:benzono (1:4) (Kahane, 1963), etanol:diethyl éter 1:1 (Kahane y Regord, 1964) o una mezcla caliente de cloroformo:metanol 2:1 (Letters, 1962). No obstante, el método utilizado por Folch y colaboradores (1957) consistente en la adición de cloroformo:metanol (2:1), con algunas modificaciones, como las llevadas a cabo por Vorbeck y Marinetti (1965), ha resultado el más idóneo en nuestro caso ya que es el que proporciona extracciones más completas.

La extracción consiste básicamente en la adición de 20 ml de metanol al homogenato, la solución se mantiene - durante cinco minutos a temperatura de ebullición y transcurrido este tiempo se añaden 40 ml de cloroformo, manteniéndose la mezcla en agitación durante dos horas a temperatura ambiente; se filtra, se concentra a presión reducida hasta 1/5 de su volumen, y con el fin de eliminar materiales insolubles y operar con un disolvente apolar más apropiado -

para solubilizar el material lipídico, se transfiere el extracto a éter de petróleo mediante sucesivas concentraciones a presión reducida, dejando un volumen final de 50 ml.

Un procedimiento muy usado para la eliminación de contaminantes no lipídicos se basa en el reparto de las soluciones etéreas en agua y soluciones ácidas sucesivamente (Folch et al 1951, 1957). Otros métodos incluyen la adsorción en celulosa (Smith, 1954); diálisis (Sinclair, 1948), electroforesis de papel (Westley, 1954) y cromatografía de papel impregnado de ácido silícico (Brezenski, 1962).

Excepto el procedimiento utilizado por Folch y el uso de cromatografía de papel impregnado con ácido silícico, se ha comprobado la ineffectividad de los otros métodos, ya que, únicamente consiguen la eliminación de aminoácidos.

En nuestro trabajo se ha procedido a la purificación del extracto realizando, en primer lugar, sucesivos lavados con agua destilada a fin de eliminar productos solubles y a continuación se lavó con 10 ml de una solución de ClNa al 75% dos veces consecutivas. Por último, se reúnen los extractos secándolos sobre SO_4Na_2 anhidro.

Del extracto obtenido se toman dos fracciones, una de ellas para la determinación de lípidos totales y contenido en fósforo lipídico y la otra para la separación de las fracciones saponificable e insaponificable.

7.2. DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES Y FOSFORO

Una de las dos fracciones descritas en el apartado anterior se divide en dos subfracciones, una de las cuales se lleva a sequedad, en atmósfera de Nitrógeno y se transfiere a un desecador de vacío con pentóxido de fósforo, donde mediante la aplicación de presión reducida, se realiza la desecación de las muestras hasta obtener un peso constante para proceder a la cuantificación de lípidos totales.

Entre la abundante metodología disponible para la valoración de fósforo, la determinación según el método de Fiske-Subbarow (1925), con modificaciones más o menos significativas, constituye uno de los procedimientos más utilizados y al que se ha dedicado una mayor atención.

El método se basa en una previa digestión y formación del ácido fosfomolíbdico que es posteriormente reducido y determinado espectroscópicamente.

Barlett (1958) mejoró la sensibilidad de dicho método, facilitando los análisis múltiples de fósforo total.

Este método, está basado en la utilización del reactivo del mismo nombre, que se prepara co-

mo sigue:

Fosfato monopotásico 0,5 mM (se añaden unas gotas de CHCl_3)

Molibdato amónico 4,4 g. $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$ en 300 ml de H_2O , se adicionan 14 ml de SO_4H_2 y se lleva a 1 litro con H_2O destilada.

El agente reductor se prepara disolviendo 30 g. de SO_4HNa , 6 g de SO_3Na_2 y 0,5 g de $\text{NH}_2\text{C}_{10}\text{H}_6\text{SO}_3\text{H} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de H_2O destilada, se deja reposar durante tres horas, se filtra y se guarda en refrigerador, permaneciendo estable durante 6-8 semanas.

Dawson (1960) señala, por otra parte, que la digestión con ácido perclórico al 70% da lugar a una rápida oxidación del material lipídico con liberación cuantitativa de fósforo en forma de fosfato inorgánico; cuando las cantidades de materia orgánica son considerablemente elevadas, la adición de unas gotas de molibdato amónico aceleran la oxidación.

El procedimiento seguido fué el siguiente: la segunda subfracción mencionada más arriba, se lleva a seque-

dad en un tubo de vidrio que se enrasa previamente a 7 ml. añadiéndose al residuo 0,8 ml de ácido perclórico al 90%. A continuación se lleva a cabo la digestión de la muestra calentándola directamente a la llama de un mechero hasta la total clarificación de la solución, con la precaución de que no se proyecte nada al exterior. Al digerido, una vez que se encuentra a temperatura ambiente, se le añade 3 ml de H_2O destilada, se neutraliza con NaOH y se añade más agua hasta completar 7 ml.

Acto seguido se adicionan 0,5 ml de molibdato amónico, se agita la mezcla durante unos segundos; se añaden a continuación 0,4 ml del agente reductor, se agita de nuevo, y se deja reposar durante 20 m. Por último, se mide la absorbancia a 885 nm frente a un blanco y a un estandar constituido por una solución acuosa de PO_4H_2K . Tanto el blanco, como la solución estandar no necesitan pasar por un tratamiento análogo al de las muestras, pero es preciso que sufran el proceso de la digestión.

Para la determinación de la cantidad de fósforo contenido en las muestras, es necesario realizar una recta de calibrado obtenida con concentraciones de fósforo conocidas, y midiendo las absorbancias a que corresponden dichas concentraciones a 885 nm. Para ello se dispone en primer -

lugar una solución estandar de $40 \mu\text{M}$ de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y a partir de esta se obtienen sucesivas diluciones que oscilan entre 1 y $40 \mu\text{M}$; con los resultados obtenidos se traza la gráfica representada en la fig. 12.

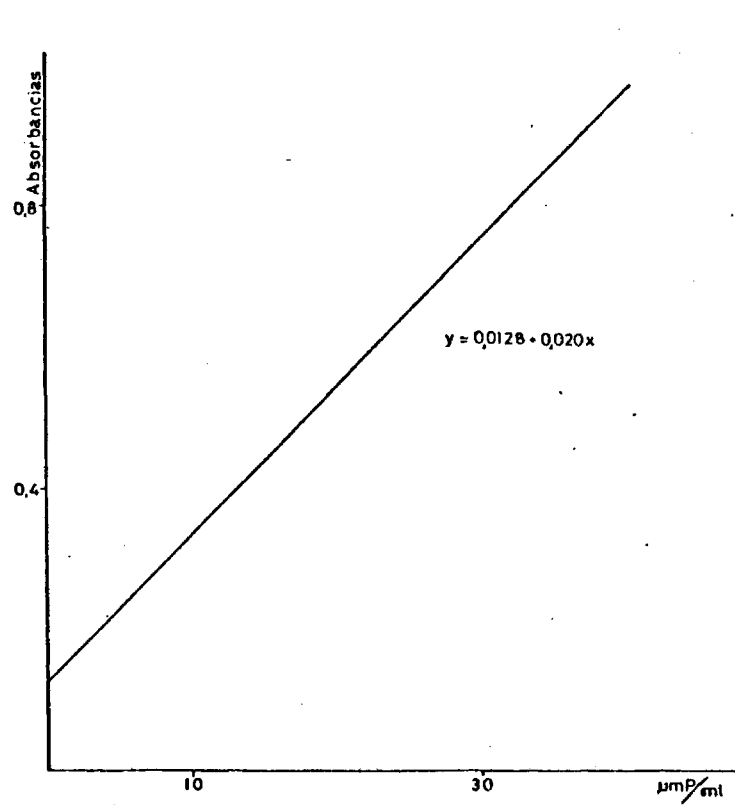


Fig. 12. Recta de calibrado utilizada en la determinación de la concentración del fósforo existente en la fracción lipídica de *Saccharomyces cerevisiae*.

7.3. SEPARACION DE LAS FRACCIONES SAPONIFICABLE E INSAPONIFICABLE.

Para llevar a cabo la separación de las fracciones - saponificable e insaponificable se efectúa una hidrólisis ácida o básica. La hidrólisis ácida, realizada con SO_4H_2 2 N en solución metanólica (Wells, 1965), es imprescindible para la ruptura del enlace acil-amido de los esfingolípidos y por consiguiente para la obtención de una hidrólisis total del material lipídico.

En el caso de los lípidos procedentes de levaduras, las proporciones de esfingolípidos son prácticamente despreciables (Reindel, 1940). Por esta razón, y por ser el método más empleado en la bibliografía (Nevenzel, 1965) y Kates (1964), se optó por la hidrólisis alcalina. Así, el extracto se concentra a presión reducida hasta un volumen de 5 ml, adicionando a continuación 10 volúmenes de una solución metanólica de KOH 1 N al 80% y manteniendo esta mezcla a reflujo, en atmósfera inerte, durante dos horas. Una vez transcurrido este tiempo, se deja enfriar la solución y se le incorpora 1 volumen de H_2O destilado.

Para la separación de la fracción saponificable de la

insaponificable se extrae con $\frac{1}{2}$ volumen de éter de petróleo y después de repetir la operación tres veces, se reúnen los extractos, se lavan con $\frac{1}{2}$ volumen de una solución acuosa 0,5 N de KOH y se añade a la porción acuosa extraída. Posteriormente se realizan sucesivos lavados con agua destilada hasta pH neutro.

7.4. PURIFICACION DE LA FRACCION SAPONIFICABLE

El material contenido en la fase acuosa está constituído en su mayor parte por ácidos grasos y posibles trazas de material insaponificable. Para purificar esta fase se - realizan tres lavados con 50 ml de éter etílico que extrae el insaponificable que puede haber quedado retenido. La posible formación de emulsiones se obvia mediante adiciones sucesivas de ClH 1 N.

Una vez eliminados los disolventes residuales al ba-ño maría, se separan los ácidos grasos acidulando la fase - acuosa con SO_4H_2 0,5 N, proceso que continúa hasta la des-aparición de los copos en suspensión. Los ácidos grasos - son extraídos con 100 ml de éter de petróleo dos veces consecutivas. La fase etérea se lava varias veces con agua para eliminar la acidez y los extractos etéreos se secan - con sulfato sódico anhidro. Se evapora el disolvente en rotavapor y el residuo se seca en un desecador a vacío sobre P_2O_5 hasta pesada constante.

7.4.1. METILACION DE LOS ACIDOS GRASOS EN EL EXTRACTO

A partir de la revisión realizada por Metcalfe (1966) el método más generalizado para la cuantificación de los ácidos grasos se basa en la formación de sus ésteres metílicos mediante el Trifluoruro de boro en metanol y posterior análisis por cromatografía gas-líquido.

Diferentes autores -Böttcher (1959), Shenk (1960) y Stoffel (1959)- han descrito diversos procedimientos para la preparación de esteres metílicos de ácidos grasos como paso previo a su análisis cromatográfico. Estos procedimientos utilizan metanol anhidro y un ácido o base como catalizador.

Aunque ya en 1940 Mitchell introdujo la utilización del reactivo de Trifluoruro de boro en solución metanólica para la esterificación de ácidos carboxílicos, fué en 1966 cuando Metcalfe y colaboradores comprobaron que los ácidos grasos se esterificaban por completo en dos minutos a temperatura de ebullición y con un exceso de reactivo.

Siguiendo el método de Metcalfe (1966), el extracto se lleva a sequedad en atmósfera de Nitrógeno y acto seguido se añaden 2 ml de Trifloruro de boro en metanol. La

mezcla se introduce en un baño de agua hirviendo y se mantiene durante dos minutos, se deja enfriar y se procede a la extracción de los ésteres metílicos, para lo cual se -
adicionan 4 ml de agua destilada y 2 ml de éter de petróleo, se agita vigorosamente y se separan ambas capas por decantación, repitiéndose el proceso dos veces más. Reunidos -
los extractos etéreos, se lavan tres veces con agua destilada y se secan con SO_4Na_2 durante dos minutos. El extracto purificado contiene solamente los ésteres metílicos de los ácidos grasos que se encuentran ya en disposición de ser analizados mediante cromatografía gas-líquido.

7.4.2. CONDICIONES DE LA CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

Se ha utilizado un aparato Perkin-Elmer, modelo F-11, con detector de ionización de llama y columnas de vidrio - Pyrex de 2 m de longitud y 3 mm de diámetro interno.

Se ensayó el comportamiento de diferentes columnas que diferían en la fase estacionaria y su porcentaje de carga; la columna rellena con 10% de succinato de etilenglicol sobre Chromosorb W-HP 80/100 mallas, ha proporcionado los mejores resultados.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:
Temperatura de la columna: 85°C para la determinación de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono, y 135°C para los de 12 a 20 átomos de carbono, temperatura del inyector: 250°C, gas portador: N₂ a un flujo de 47 ml/min.

Se ensayaron diversos caudales de hidrógeno y aire suministrados al detector y se encontró que un aporte de 70 ml/min de cada uno de los gases producía respuestas más intensas dentro de los márgenes de baja concentración de los ácidos grasos con que se operaba.

Una de las modificaciones introducidas para intentar la separación de todos los ácidos grasos a una misma tempe-

ratura fué la adición de ácido fosfórico en una proporción del 0,16% para aumentar la polaridad de la fase. Los rendimientos obtenidos por este procedimiento fueron poco significativos y se obtienen mejores resoluciones sin la adición del ácido fosfórico. Algunos autores (Moss, 1974), - emplearon columnas de poca polaridad, como la OV-1 al 3%, pero al ser ensayadas se obtenían cromatogramas de resolución baja.

7.4.3. IDENTIFICACION Y DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS
ACIDOS GRASOS

Para la identificación de los ácidos grasos se siguió el criterio basado en los tiempos de retención de sus ésteres metílicos.

Refiriéndonos exclusivamente a los ácidos que entran normalmente en la composición de la fracción lipídica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aparecen en el cromatograma en orden creciente de sus átomos de carbono y a su insaturación como está ya bien establecido en la cromatografía de gases de ácidos grasos.

En los cromatogramas obtenidos aparecen constatemente señales que corresponden a ácidos grasos de número par de átomos de carbono saturados y con una sola insaturación, desde C_8 a C_{18} , siendo las insaturaciones los ácidos palmitoleico y oleico fundamentalmente. Aparecen otras inflexiones menos significativas, caracterizada una como un ácido impar, el C_{15} saturado, y otras menos importantes, cuya caracterización resulta muy insegura.

Como la abundante bibliografía que existe, señala que la composición de la parte lipídica del *Saccharomyces cerevisiae* hasta ahora detectada, es relativamente sencilla, no -

apareciendo ácidos insaturados, otros de cadena impar o ramificada, o con ácidos o grupos hidroxilo; se han despreciado las señales del cromatograma que presentaban inflexiones muy pequeñas respecto a la línea de base. De otras señales algo más significativas pero no identificadas se hará mención de ellas en los casos más importantes. Por lo tanto, solo se tienen en cuenta las inflexiones más representativas que coinciden con los ácidos grasos más importantes y que parecen tener un mayor significado en la biología de la levadura objeto de este trabajo, y que, desde un punto de vista comparativo, daran mayor certeza al intento que se propone en este estudio respecto a las posibles inhibiciones de la biosíntesis lipídica.

Las determinaciones cuantitativas se llevan a cabo comparando, en los cromatogramas correspondientes a las muestras a valorar y a soluciones estandar de concentración conocida, las áreas de señales con idénticos tiempos de retención. A fin de evitar posibles errores debidos a la falta de linealidad en la respuesta del detector, dicha comparación se lleva a cabo entre señales de magnitud sensiblemente iguales; la aplicación de factores de corrección para cada ácido graso es innecesaria, dado que la cuantificación se lleva a cabo comparando las señales problema con

las obtenidas de una solución estandar inyectada inmediatamente, con la sola precaución de conseguir una similitud en la magnitud de las señales.

El grado de conservación de la composición de una mezcla de ácidos grasos, se evalúa a través del criterio de la variación del perfil cromatográfico, de igual forma que en el caso de la evaluación de los PCBs.

Constatada la conservación del perfil cromatográfico, para la cuantificación de los ácidos grasos se procede a la comparación de las áreas de cada señal problema con su patrón correspondiente.

7.5. PURIFICACION DE LA FRACCION INSAPONIFICABLE

El extracto etéreo descrito en el apartado 7.3., - que contiene la fracción insaponificable, se lava varias - veces con una solución de potasa 0,5 N, con el fin de eliminar trazas del material saponificable que pudiesen quedar en la fase orgánica y posteriormente se lava con agua hasta eliminar la alcalinidad del medio orgánico.

Del extracto obtenido se separan los esteroides en forma de sus derivados digitonidos (Longley, 1968) para lo cual se procede de la siguiente forma:

Una vez reunidos todos los lavados, se evaporan a - sequedad y el residuo se disuelve en 10 ml de acetona-metanol (1:1 v/v), y, acto seguido se adicionan 2,5 ml de una solución de digitonina al 2% (w/v) en etanol al 80% (v/v), e inmediatamente después, 2,5 ml de H₂O destilada (Sperry, 1963). La solución se mantiene durante la noche a temperatura ambiente con el fin de conseguir la completa precipitación de los digitonidos de esteroides. El precipitado se lava con sucesivas porciones de 8 ml de etanol 80% (v/v), acetona de éter dietílico (1:1 v/v) y éter dietílico anhidro evaporándose a sequedad en atmósfera de Nitrógeno. La obtención de los esteroides libres a partir de sus derivados

de digitonina tiene lugar mediante la adición de 0,6 ml de piridina anhidra y posterior calentamiento durante 10 min. a 70°C. Transcurrido este tiempo, se añaden 6 ml de éter dietílico anhidro y el precipitado de digitonina se elimina por centrifugación a 1.500 g durante 10 min. La solución sobrenadante, que contiene los esteroides libres, se transfiere a un tubo de 50 ml. El precipitado de digitonina se lava tres veces consecutivas con éter dietílico (3 x 5 ml). La piridina se elimina colocando la solución en un desecador a vacío sobre SO_4H_2 durante 12 horas; transcurrido este tiempo se lleva el extracto a sequedad y se redisuelve en un pequeño volumen de éter de petróleo.

7.5.1. PREPARACION DE DERIVADOS DE ESTEROLES CONTENIDOS EN LOS EXTRACTOS

Hasta 1960 las separaciones de esteroides por Cromatografía gas-líquido eran prácticamente imposibles. La creencia de que compuestos de elevado punto de ebullición a la presión atmosférica tenían unos tiempos de retención excesivamente altos, no era del todo cierta, ya que, hablando en términos termodinámicos es la energía libre de la solución, más que el punto de ebullición, lo que determina el tiempo de elución de un soluto.

La descomposición de los esteroides, cuando se tratan a altas temperaturas, es otro factor a tener en cuenta; el mejor camino, para reducir tiempos de retención y temperaturas, es la disminución de la cantidad de fase -usando un soporte especialmente desactivado- (Van den Heuvel, 1960), siendo éste método ampliamente aceptado hoy en día (Horning, 1963).

El tiempo de retención de un soluto en una fase no polar (SE-30) depende del peso molecular y configuración del compuesto, por lo cual se utilizan para la separación de esteroides y otros hidrocarburos afines; pero cuando se emplea una fase selectiva, la separación depende más de la

naturaleza del grupo funcional que de la configuración. Polímeros de siloxano con grupos B-cianoetil (XE-60), muestran una selectividad en la separación de compuestos que difieran en el grupo funcional (Van den Heuvel, 1961).

Pese a que la determinación de los esteroides libres por cromatografía gas-líquido, utilizando una fase no selectiva de bajo porcentaje de carga, (SE-30 al 1%), se ha descrito ampliamente en la bibliografía (Kato, 1975; Kato, 1976) los resultados obtenidos por nosotros no han sido enteramente satisfactorios, ya que la resolución cromatográfica era deficiente. Otros autores (Idler y Safe, 1972), experimentaron con los derivados acetilados de los esteroides, con el inconveniente de que aumentan los tiempos de retención pero tienen la gran ventaja de que permanecen inalterados durante tiempo indefinido.

La formación de trimetil silil éter derivados de los esteroides extraídos de las levaduras, ha conducido a mejores resultados, obteniéndose una relación tiempo de retención/temperatura del horno/resolución de los picos, sumamente aceptable.

La preparación de dichos derivados es una operación sencilla, efectuándose de la siguiente forma: El extracto

de los esteroides en éter de petróleo se evapora a sequedad en atmósfera de Nitrógeno, a continuación se adiciona 1 ml de una mezcla formada por N,N-dimetil formamida - hexametil disilozana y tetrametil clorosilano en una relación 40:40:1 (v/v) para una concentración de 0,2 mg/ml de esteroide, dejándolo reposar a 20°C durante 45 minutos; se lleva a sequedad y se disuelve en un pequeño volumen (0,5 ml) de ciclohexano. Los trimetil silil éter derivados así preparados están en disposición de ser determinados por C.G.L.

7.5.2. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS PARA LA IDENTIFICACION
Y CUANTIFICACION DE LOS ESTEROLES

La determinación de los trimetil silil éteres de los esteroides se llevó a cabo en un aparato Perkin-Elmer, modelo 3920 B, con detector de ionización de llama, utilizando columnas de vidrio Pyrex, de 2 m de longitud y 3 mm de diámetro interno.

Se ensayaron distintos tipos de fases estacionarias, variando a su vez el porcentaje de carga de las mismas, siendo las columnas rellenas con XE-60 y SE-30, fases estacionarias de polaridad semejante, las que condujeron a resultados más satisfactorios. Concretamente las mejores separaciones se consiguieron con la columna constituida por SE-30 al 3% soportada en Chromosorb W-HP 80/100 mallas (Kato, 1975 -, 1976).

Las condiciones de trabajo para la columna de fase SE-30, fueron las siguientes:

Temperatura de la columna: 235°C

Temperatura del detector: 235°C

Temperatura del inyector: 250°C

Gas portador: N₂ con un flujo de 60 ml/min.

Hidrógeno: 40 ml/min.

Aire: 80 ml/min.

En la fig. 13 se esquematiza el comportamiento de las columnas rellenas con 3% de SE-30 y con 1% de XE-60. La primera resuelve aceptablemente las señales correspondientes a 5 esteroides, mientras que la segunda da lugar a un solapamiento entre 2 de ellos.

La identificación por C.G.L. de los esteroide-derivados, resultó muy laboriosa debido a la dificultad de encontrar patrones adecuados; sin embargo, mediante la preparación de soluciones estándar de identidad conocida se pudieron determinar con seguridad tres de las cinco señales que aparecen en los perfiles cromatográficos de los extractos, concretamente las del escualeno, ergosterol y lanosterol, realizándose dicha identificación por comparación entre señales de magnitud sensiblemente iguales, en dos columnas de 1% de XE-60 y 3% de SE-30 coincidiendo en ambos casos los tiempos de retención de las señales de las muestras y de los patrones previamente preparados. La imposibilidad de conseguir patrones de pureza cromatográfica, para la identificación del resto de esteroides presentes en los extractos de los hongos estudiados, dificultó sobremanera la iden-

tificación de los mismos. No obstante, se ha tenido en cuenta el estudio realizado por Hunter (1971), sobre la composición de lípidos en las levaduras, que identifica como esteroides mayoritarios el ergosterol y el zimosterol, que anteriormente habían identificado Wieland (1942), Usden (1952) y Dulaney (1954), mientras que el lanosterol (Wieland, 1931) y el episterol (Breivik, 1954), son componentes minoritarios. Los trabajos realizados por Longley et al. (1968), apuntan, sin embargo, como componente mayoritario el zimosterol siendo minoritarios los otros tres. Con estas premisas y nuestros resultados se asumió que las otras dos señales correspondían al zimosterol y al episterol. Teniendo en cuenta los perfiles cromatográficos facilitados por la bibliografía, así como los tiempos de retención de estos compuestos (Kato, 1975; Longley, 1968; Buchenauer, 1977 y 1978; Horning, 1963_a y Satyaswaroop, 1977), se llegó a la conclusión de que el orden de salida de los esteroides en la columna de SE-30 es el siguiente: zimosterol, episterol, ergosterol y lanosterol; el escualeno con un tiempo de retención más corto, eluye el primero.

En la figura 13 se muestra el cromatograma correspondiente a los esteroides procedentes de un extracto de células de *Saccharomyces cerevisiae*.



Fig. 13. Perfil cromatográfico de los esteroides presentes en un extracto de *Saccharomyces cerevisiae*.

8. INFLUENCIA DE LOS PCBs EN ACTIVIDADES BASICAS DE
Saccharomyces cerevisiae

Las levaduras son organismos apropiados para el estudio de los efectos de diferentes contaminantes ambientales sobre algunos procesos bioquímicos en los que están implicados ciertos sistemas enzimáticos. Se conoce por los trabajos de Yehida et al (1974) que algunos hidrocarburos clorados como el hexaclorobenceno, retardan el proceso de la fermentación y alteran la cinética de la formación de etanol en el *S. cerevisiae*.

Una inhibición análoga fué encontrada por Sing et al (1977) al experimentar con los insecticidas organoclorados heptacloro, endrin, lindano y DDT. Otros agentes contaminantes como algunos insecticidas de fósforo, ejercen influencia notable sobre la actividad catalásica de *S. cerevisiae* a través de un proceso que disturba el metabolismo oxidativo (Pacheka y Krolewska, 1977).

8.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CATALASICA

Se realizan cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en medio fermentable (Glucosa 1%) adicionandolos 25 y 50 ppm de Aroclor 1232 y 1254. Se seleccionaron dichas mezclas por ser la primera la que ejerce un mayor efecto sobre el metabolismo de las levaduras, mientras que la segunda es la que con mayor frecuencia se detecta en el análisis residual de PCBs en sustratos biológicos; Hernández (1976).

Previamente a la determinación de la actividad catalásica se traza la curva estandar que relaciona el peso seco de las células con la absorbancia a 340 nm de una suspensión de las mismas.

La determinación de dicha actividad en las células cultivadas se lleva a cabo siguiendo la metodología de Pacheka (1971), que básicamente consiste en un doble lavado con agua destilada de las células, centrifugación, resuspensión en agua -siendo deseable la obtención de una concentración final de 1,5-2,5 mg de peso seco/ml- y tratamiento de una alícuota de la suspensión con cloroformo.

La actividad catalásica se evalúa en la fase acuosa por método volumétricos; se ha ensayado el método de Von -

Euler modificado por Sumner y Dounce (1955), cuya valoración se efectúa con permanganato potásico, siendo este - último el que mejores resultados ha dado; discrepa en ello Bonnichsen et al (1947) que estiman que en el método de - Von Euler, la destrucción de la enzima por el agua oxigenada origina alteraciones en los valores de la actividad.

Así pues, para la incubación y valoración de la enzima, siguiendo el método de Von Euler, se preparan los siguientes reactivos: H_2O_2 0,0067 M en tampon fosfato (PH= 6,8). H_2SO_4 2 N y MnO_4K_2 0,005 N.

A 50 ml de H_2O_2 0,01 N mantenidos a 0°C, se añade 1 ml de la fase acuosa que contiene la catalasa, se mezcla rapidamente y se toma una alicuota de 5 ml que se transfiere a un vaso de precipitados que contiene 5 ml de SO_4H_2 2N, con objeto de detener la reacción. Posteriormente se toman otras alicuotas a 3, 6, 9 y 12 minutos, procediéndose de - la misma forma; finalmente, se valora el resto de peróxido de hidrógeno, que no ha sufrido la acción de la catalasa, con permanganato potásico 0,005 N, calculando la constante K de la velocidad de la reacción, mediante la siguiente expresión:

$$K = \frac{1}{t} \log_{10} \frac{A}{A-X}$$

K = constante de la velocidad de reacción

t = tiempo en minutos

A = mililitros de permanganato potásico que se han usado
al tiempo cero

A-X = mililitros de MnO_4K usados a los 3,6,9 y 12 min.

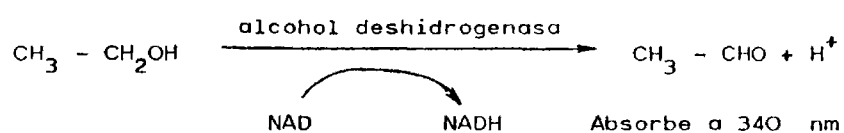
Se traza una gráfica de los tiempos empleados frente a la constante de la velocidad K. Los valores de K a tiempo cero se obtienen por extrapolación, siendo estos - valores los que representan las unidades de catalasa a la dilución empleada en la medición, como se expone en los resultados.

8.2. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA

Con objeto de valorar la incidencia de los PCBs sobre la producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, se realizaron cultivos de la levadura en medio fermentable adicionados de 50 ppm de los Arocloros 1242, 1248, 1254 y 1260, y recogiendo la biomasa a las 44 horas de cultivo. Se utilizaron concentraciones de glucosa de 1% y 3% a fin de obtener un mayor porcentaje de etanol y facilitar la cuantificación del mismo. La determinación del etanol producido se realiza después de separar la levadura del medio acuoso por centrifugación.

Se han ensayado dos métodos para determinar el alcohol, uno enzimático y otro físico. El método enzimático se llevó a cabo siguiendo la metodología empleada por Nathan et al (1955), que es una modificación de la utilizada por Bonnichsen et al (1951), la cual se basa en la deshidrogenación del etanol en presencia de NAD y de alcohol deshidrogenasa, determinándose en el espectro de U.V. a 340 nm el NADH formado.

La alcohol deshidrogenasa cataliza la siguiente reacción:



La forma reducida del nucleótido NADH muestra su máximo de absorbancia a 340 nm mientras que la forma oxidada NAD se extingue prácticamente a partir de 300 nm, como se observa en la fig. 14.

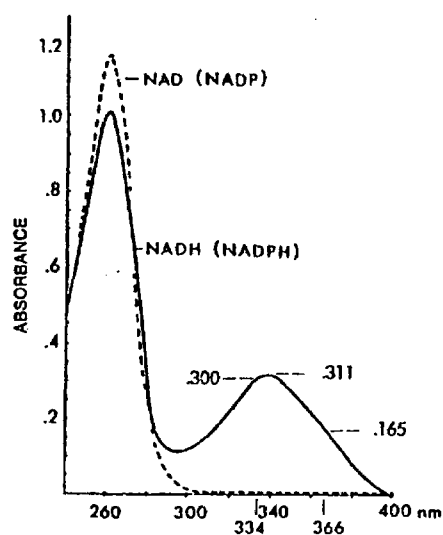


Fig. 14. Espectro de Absorción del NAD y NADH

100.

El procedimiento que se utilizó fué el siguiente:

Se preparan las soluciones:

A : 800 γ de NAD (80% de pureza) disueltas en tampón de PH = 9,2.

B : 0,8 mg/ml de alcohol deshidrogenasa en solución tampón de PH = 9,2.

La solución tampón de PH = 9,2 tiene la siguiente composición:

7 volúmenes de glicocola 0,1 N en NaCl 0,1 N

3 volúmenes de NaOH 0,1 N

1 volumen de solución de semicarbácida (1,12 g de semicarbácida en 100 ml de NaOH 0,1 N).

Previamente se traza una curva patrón empleando las siguientes concentraciones de etanol: 0,205; 0,411; 0,686 y 1,32 μ moles, así como un blanco que lleva todos los reactivos menos el etanol.

Las reacciones se efectúan directamente en las cubetas adicionándose los reactivos en el siguiente orden:

A la solución de 800 γ de NAD se añade la solución de etanol, que no debe exceder de 1 ml., el volumen se lleva a 3,2 ml con la solución tampón y se procede a la lec-

tura de la absorbancia a 340 nm., añadiéndose posteriormente 0,04 ml de la enzima alcohol deshidrogenasa, permaneciendo 30 min. a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo se vuelve a medir la absorbancia a 340 nm, obteniéndose de esta forma la cantidad de NADH formado y consecuentemente la del etanol que hay en el medio.

El método físico consiste básicamente en la medida de una constante del etanol, una vez extraído del medio mediante destilación. Una vez separadas las células del medio de cultivo por centrifugación y siguiendo el método utilizado por Singh (1977), se destila la fracción sobrenadante a una temperatura constante de 78°C, recogiendo un volumen total de 25 ml y determinando el índice de refracción a 25°C en un refractómetro de inmersión ZEISS nº 51804. El porcentaje de alcohol correspondiente a las medidas de dicho índice de refracción se determinan utilizando la tabla 43.023, de Official Methods of Analysis 873-877 de Horwitz (1965).

Ambos métodos se ensayaron en dos series de cultivos de levaduras realizados paralelamente de idéntica forma y los resultados obtenidos estaban comprendidos dentro de los mismos límites de error permitidos, por lo que se decidió

102.

utilizar el método del índice de refracción por su mayor
simplicidad y rapidez.

8.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ALCOHOL DESHIDROGENASICA

Los cultivos se realizaron de manera análoga a la descrita en el capítulo anterior, recogiendo los mismos - después de un desarrollo de 47 horas.

Siguiendo el método descrito por Racker (1955), el material biológico, separado del medio mediante centrifugación, se deseca a temperatura ambiente durante cuatro días; a continuación se homogeniza en mortero con arena de cuarzo, se adiciona un volumen conveniente (20 ml) de solución tampón 0,06 M de pirofosfato sódico de PH 8,5, manteniéndose en constante agitación durante 2 horas a 37°C y 3 horas más a temperatura ambiente; transcurrido este tiempo - se separa la levadura por centrifugación a 8.000 rpm durante 60 min. El sobrenadante se mantiene en baño de agua a 55°C durante 15 min., se centrifuga nuevamente para obtener un líquido claro que se mantiene a 0°C durante una noche. A continuación se realiza la valoración de la enzima, basándose en la absorción del NADH a 340 mμ, como se describe anteriormente.

Los reactivos utilizados fueron: etanol 3 M; pirofosfato sódico 0,06 M de PH = 8,5 y NAD 0,0015 M. La reacción se efectúa en cubetas de cuarzo, añadiendo los -

reactivos en el siguiente orden: 2,2 ml de agua destilada; 0,5 ml de solución tampón; 0,1 ml de etanol y 0,1 ml de NAD. Las cubetas control contienen todos los reactivos - excepto el sustrato. La primera medida de la absorbancia a 340 nm se realiza 15 seg. después de la adición del sustrato, realizándose con un intervalo de 15 seg. cada una de las medidas posteriores. El incremento de la densidad óptica en el intervalo de medida (60 seg.) se toma como - la actividad enzimática por minuto.

105

III. RESULTADOS Y SU INTERPRETACION

1. INCIDENCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE MEZCLAS
DE PCBs.

El primer objetivo planteado, consistió en el estudio de las posibles alteraciones en la estructura de los PCBs atribuibles a la acción metabólica del *Saccharomyces cerevisiae*. A tal fin, se dosificaron cultivos glucosados y etanolados de la levadura con 25 ppm de los Arocloros - 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260 con objeto de estimar cromatográficamente las variaciones de los perfiles cromatográficos correspondientes a soluciones estandar de los Arocloros y de los extractos obtenidos de las células.

En la figura 15 se comparan dos cromatogramas correspondientes a una solución patrón de Aroclor 1254 con el extracto de un cultivo de *S. cerevisiae* al que se ha incorporado el mismo tipo de Aroclor. La patente identidad de las señales que integran los perfiles cromatográficos, permiten afirmar que dicho Aroclor no sufre transformación alguna que pueda ser atribuible a la acción de *S. cerevisiae*. Esto se ve confirmado por el hecho de que una vez concluido el período de incubación se recupera en proporciones tales que, teniendo en cuenta la recuperabilidad ya constatada -del orden del 90%- resulta muy semejante a la cantidad -

adicionada. Se realizaron las mismas comparaciones con el resto de los Arocloros ensayados obteniéndose resultados - análogos. Tan sólo en los Arocloros menos clorados, con señales de menor tiempo de retención, se observa una ligera disminución en el área de los picos del extracto, respecto a las muestras patrón. Este descenso no es debido a factores de biodegradabilidad, sino a pérdidas habidas durante las fases de extracción y purificación, ya que estas señales corresponden a los compuestos más volátiles de la mezcla. Análogos resultados se obtienen suplementando los cultivos con 50 ppm de los mismos Arocloros.

Son frecuentes las referencias bibliográficas acerca de la estabilidad de estos compuestos a la acción metabólica de muchos seres vivos. Hernández (1974, 1976) aporta ejemplos en un estudio llevado a cabo con varias especies faunísticas. Por el contrario, otros autores (Moza, 1974 y Greb, 1975) demuestran que se producen ligeras transformaciones en la molécula de los PCBs -fundamentalmente hidroxilaciones- pero no se conoce hasta ahora que la acción metabólica realice transformaciones en estos compuestos, - que nos permita hablar de un verdadero proceso de degradación.

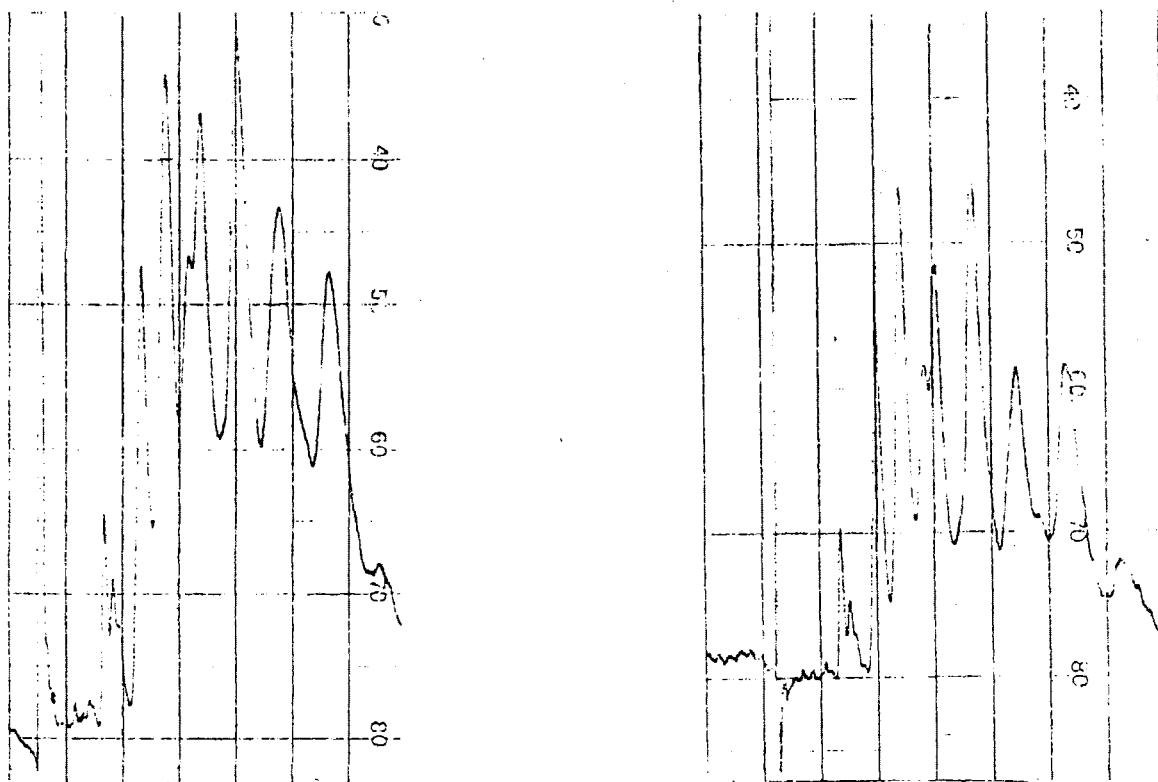


Fig. 15. Perfiles cromatográficos procedentes de soluciones estandar (izquierda) y de un extracto de células de *S. cerevisiae* incubadas con el mismo Aroclor (derecha)

2. INCIDENCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE PCBs INDIVIDUALES

Con objeto de concretar si alguno de los componentes individuales de las mezclas de PCBs sufre algún tipo de decaimiento imputable a la acción metabólica de la levadura, se adicionaron cuatro bifenilos típicos de diverso grado de cloración a los cultivos de *S. cerevisiae*. Los bifenilos seleccionados lo fueron en función de haberse comprobado su metabolización por diferentes seres vivos; tal es el caso del 2,2'-diclorobifenilo por *Veronica beccabunga* (Moza, 1973) del 2,4'-diclorobifenilo y del 2,5,2'-triclorobifenilo por *Macacus rhesus* (Greb, 1973) y del 2,2',5,5'-tetraclorobifenilo por rata y paloma (Hutzinger, 1972).

Una vez sometidos los PCBs arriba citados a la acción de la levadura se observa que en todos los experimentos llevados a cabo no se comprueba transformación alguna de los diferentes bifenilos policlorados ensayados. En efecto, los perfiles cromatográficos correspondientes a las soluciones patrón de los PCBs utilizados, no difieren cualitativamente de los obtenidos de los extractos celulares de *S. cerevisiae* tanto en medio fermentable como no fermentable. Ahora bien, en este caso, las recuperabilidades obtenidas son claramente inferiores a las observadas en el capítulo

anterior, con lo cual podría pensarse en algún tipo de transformación metabólica en los PCBs menos clorados, aunque es sumamente probable que las pérdidas sean debidas a procesos de volatilización y codestilación habidos durante las etapas de extracción, purificación y análisis cromatográfico. de los compuestos estudiados, dado que los bifenilos implicados se recuperan en tanto mayor cantidad cuanto mayor es su porcentaje de cloración y menor su volatilidad.

3. RESPUESTA DE *Saccharomyces cerevisiae* A LA PRESENCIA
DE MEZCLAS DE PCBs

Una vez constatada la incapacidad del *S. cerevisiae* para originar transformaciones en la estructura de las mezclas de PCBs, se ha intentado conocer la incidencia de dichos compuestos sobre el desarrollo de la levadura, evaluándose esta influencia en función de la variación del peso seco de la biomasa.

En primer lugar se relacionó la biomasa producida por cultivos control con la que proporcionan cultivos tratados con 50 ppm de los Arocloros 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260, utilizándose en todos los casos medios fermentables. Los resultados obtenidos -recogidos en la figura 16- ponen de manifiesto una clara implicación de los xenobióticos añadidos en el desarrollo de *S. cerevisiae*, ya que en todos los casos los niveles de biomasa son inferiores a los que proporcionan los cultivos control. Este decaimiento se correlaciona de forma inversa con el grado de cloración ya que el A-1232 es el que promueve un mayor descenso de la masa celular, mientras que el resto de los Arocloros -1260, 1254, 1248 y 1242, y precisamente por este orden- dan lugar a unos valores de biomasa ligeramente inferiores a los



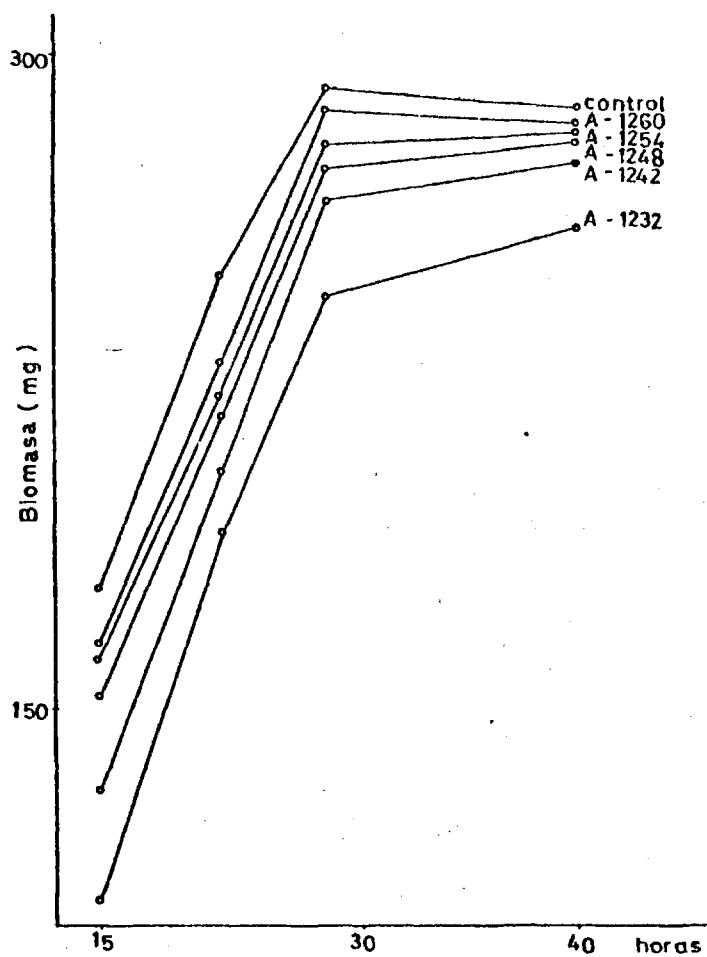


Fig. 16. Incidencia -estimada en términos de variación del peso seco de la biomasa- de 50 ppm de diferentes Aroclorés sobre el desarrollo de *S. cerevisiae* en medio glucosado al 1%.

que proporcionan los cultivos carentes de PCBs.

Esta tendencia se pone ya de manifiesto desde las primeras horas de cultivo, y así a las 15 horas de producen las máximas diferencias entre las distintas biomasas, pero estas se atenúan a medida que aumenta el tiempo de cultivo, de tal forma que llega a ser mínima hacia el final de la fase estacionaria.

Se efectuaron ensayos idénticos introduciendo una única variación, consistente en la sustitución de la glucosa, como fuente de carbono, por etanol. Los resultados -expuestos en la figura 17- confirman la validez del razonamiento anterior con la única e importante excepción de que los cultivos adicionados con los Arocloros 1254 y 1260 exceden en su crecimiento desde etapas precoces del desarrollo a los niveles alcanzados por los controles. Esta ligera estimulación del crecimiento no parece que pueda ser atribuida a una posible utilización de los PCBs como fuente carbonada por parte del microorganismo, como lo demuestra el hecho de la recuperación -sin transformación alguna- de los Arocloros, una vez concluido el período de incubación.

De la comparación de las figuras 16 y 17 surge la evidencia de que los cultivos que crecen en medios fermenta-

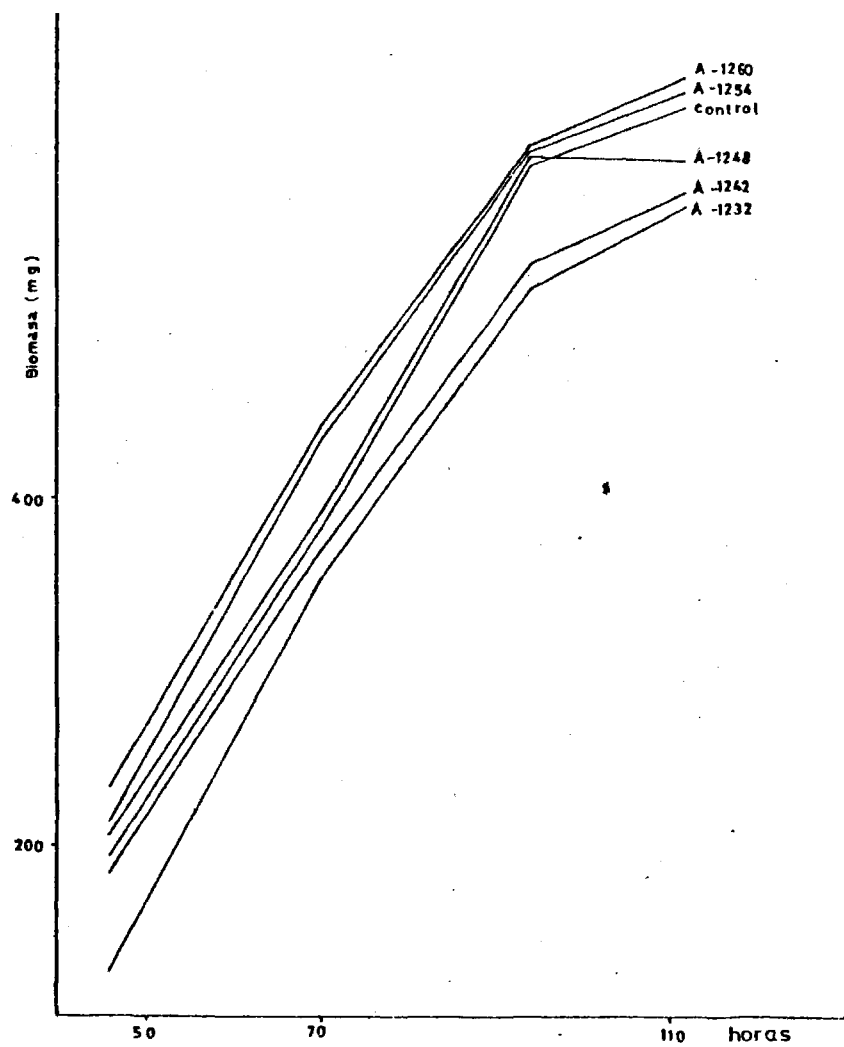


Fig. 17. Incidencia -estimada en términos de variación del peso seco de la biomasa- de 50 ppm de diferentes Aroclor sobre el desarrollo de *S. cerevisiae* en medio etanolado al 2%.

bles lo hacen a mayor velocidad que los que se encuentran en un medio no fermentable. Sin embargo, estos últimos dan lugar a rendimientos superiores a aquellos, cuando se correlacionan los valores de biomasa obtenidos al final de los respectivos períodos de incubación.

Establecido el grado de incidencia de los diferentes Arocloros, se suplementaron cultivos de *S. cerevisiae* con concentraciones crecientes (5, 10, 25 y 50 ppm) del que se había revelado como más activo. En la figura 18 se trazan las rectas que resumen los valores encontrados y que permiten apoyar la evidencia de la inhibición en el crecimiento de la biomasa, que es tanto más intensa cuanto mayor es la concentración del xenobiótico añadido, si bien la inhibición no parece aumentar proporcionalmente con el incremento de la concentración.

Determinada la incidencia de los diferentes Arocloros ensayados pareció lógico plantear la cuestión de si los xenobióticos adicionados promueven algún tipo de adaptación del cultivo. Los trabajos realizados a este respecto en este laboratorio (Tejedor, 1977) apuntan hacia la inexistencia de cambios mutacionales por la presencia de estos contaminantes. Por otra parte, los resultados reflejados en

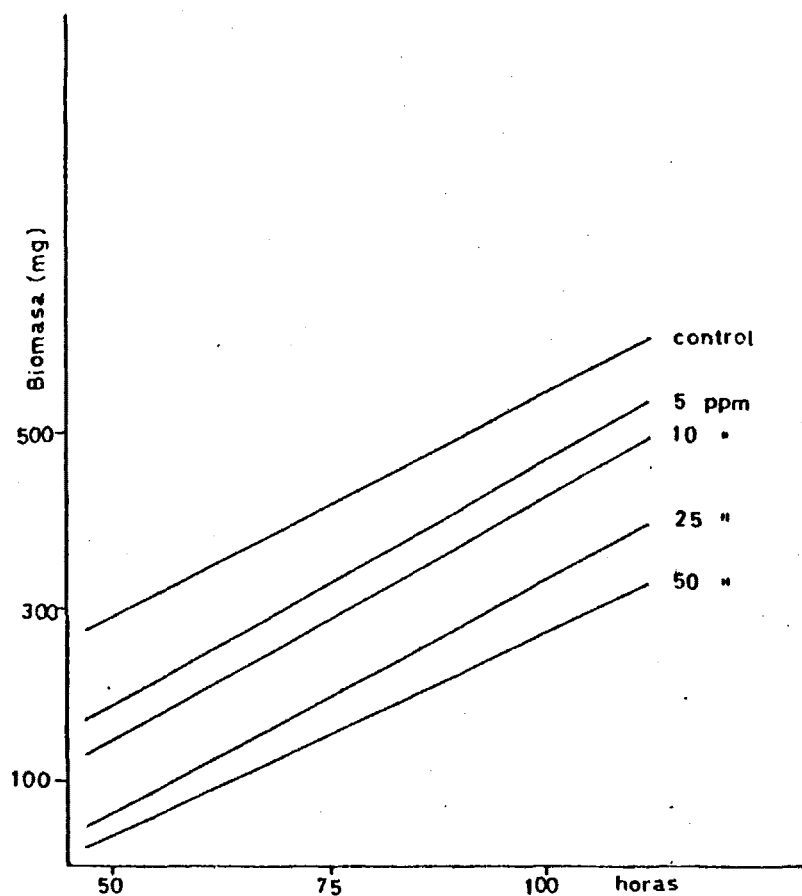


Fig. 18. Incidencia -estimada en términos de variación del peso seco de la biomasa- de diferentes concentraciones de Aroclor 1232 sobre el desarrollo de *S. cerevisiae* en medio etanolado al 2%.

las gráficas 16 y 17 demuestran que en las primeras etapas del crecimiento las diferencias entre las biomásas de los - cultivos control y las adicionadas con PCBs son proporcionalmente mayores a las que se constatan en la fase final del - desarrollo, lo que induce a considerar la posibilidad de que se produzcan adaptaciones de tipo fisiológico, en los que ca da célula, individualmente considerada, en respuesta directa a la presencia en su entorno de un agente disturbador, sufre un cambio que facilita su supervivencia.

Con el objeto de dar mayor apoyo a esta hipótesis, se efectuaron cultivos de *S. cerevisiae* en medio glucosado a - los que se adicionaron 5,10,25 y 50 ppm de Aroclor 1232, - con la única diferencia respecto a las experiencias ya des critas de que el inóculo de partida proviene de un cultivo que se ha desarrollado en presencia de 50 ppm del mismo Aroclor. La similitud entre las dinámicas de crecimiento expuestas en la figura 16 y las recogidas en la figura 19, pone de manifiesto un comportamiento análogo pese al distinto origen del inóculo.

A fin de discernir la causa de la ligera estimulación en el crecimiento, comprobada en los cultivos en medio no - fermentable adicionado con los Arocloros 1254 y 1260, se llevaron a cabo dos tipos de cultivos, unos idénticos a los

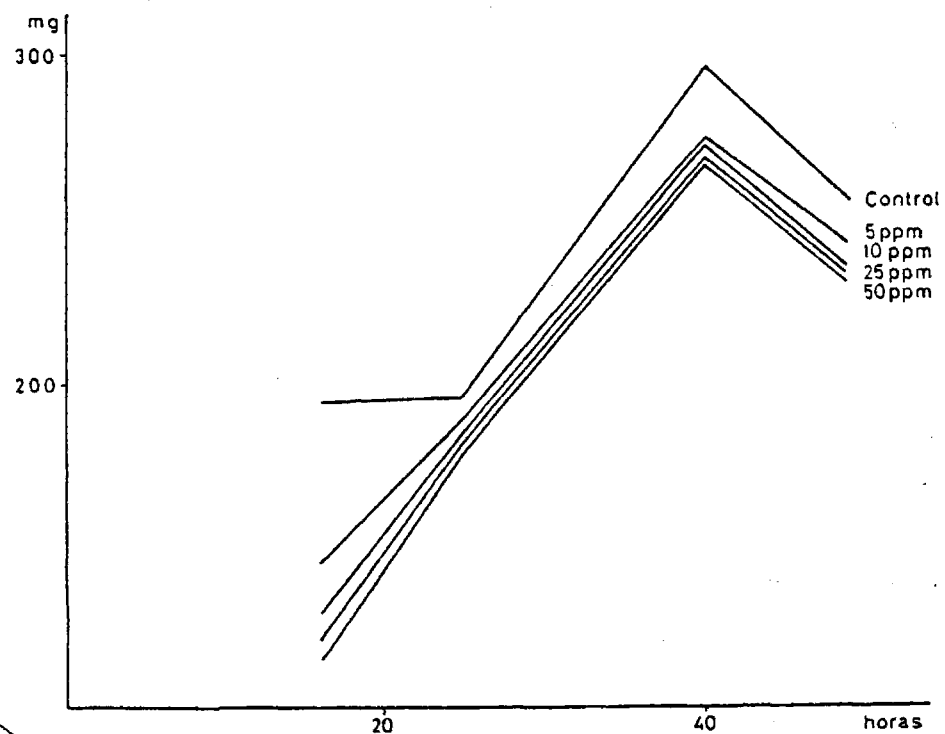


Fig. 19. Incidencia -estimada en términos de variación del peso seco de la biomasa- de diferentes concentraciones de Aroclor 1232 sobre el desarrollo de células de *S. cerevisiae*; partiendo de un inóculo "habitado" a la presencia del mismo xenobiótico, en medio glucosado al 1%.

descritos y otros que diferían en que los inóculos utilizados procedían de sendos cultivos desarrollados en presencia de 50 ppm de los Arocloros mencionados. Los resultados obtenidos de la adición de 50 ppm de A-1260 y resumidos en la figura 20, ponen de manifiesto la inexistencia de diferencias significativas entre las biomasas procedentes de cultivos inoculados con células procedentes de inóculos distintos. Los resultados con A-1254 son enteramente análogos.

Por lo tanto, las masas celulares obtenidas de cultivos desarrollados a partir de inóculos "habituados" no difieren significativamente de los que crecen a partir de células "no habituadas" mostrando, en ambos casos, un comportamiento análogo, aunque la levadura que se desarrolla en presencia de 50 ppm del Aroclor 1260 presenta niveles ligeramente superiores a los de sus correspondientes controles.

Este comportamiento parece pues confirmar la hipótesis de la adaptación fisiológica o fenotípica de cada célula frente al contaminante presente en su entorno.

Para complementar el estudio de la incidencia de los PCBs sobre la biomasa de *S. cerevisiae* se han correlacionado los porcentajes de inhibición producidos por 5, 10, 25 y 50 ppm de A-1232 respecto a los controles, seleccionado aquel

en virtud de ser el que mayores efectos tóxicos comporta - (figura 21). De las rectas obtenidas, cuyas ecuaciones se anotan, se deduce que la DI_{50} es mayor en el caso de los cultivos con fuente de carbono fermentable que en ausencia de esta. Así, en cultivos glucosados la DI_{50} se estima en 47,9 ppm, y en cultivos etanolados se sitúa en torno a las 25 ppm. Asimismo, se ha intentado determinar las DI_{50} en el resto de los Arocloros ensayados, pero los resultados obtenidos se sitúan a niveles de ppm muy superiores a los - adicionados a los cultivos, por lo que carece de sentido - hacer consideraciones toxicológicas por las desproporciones encontradas.

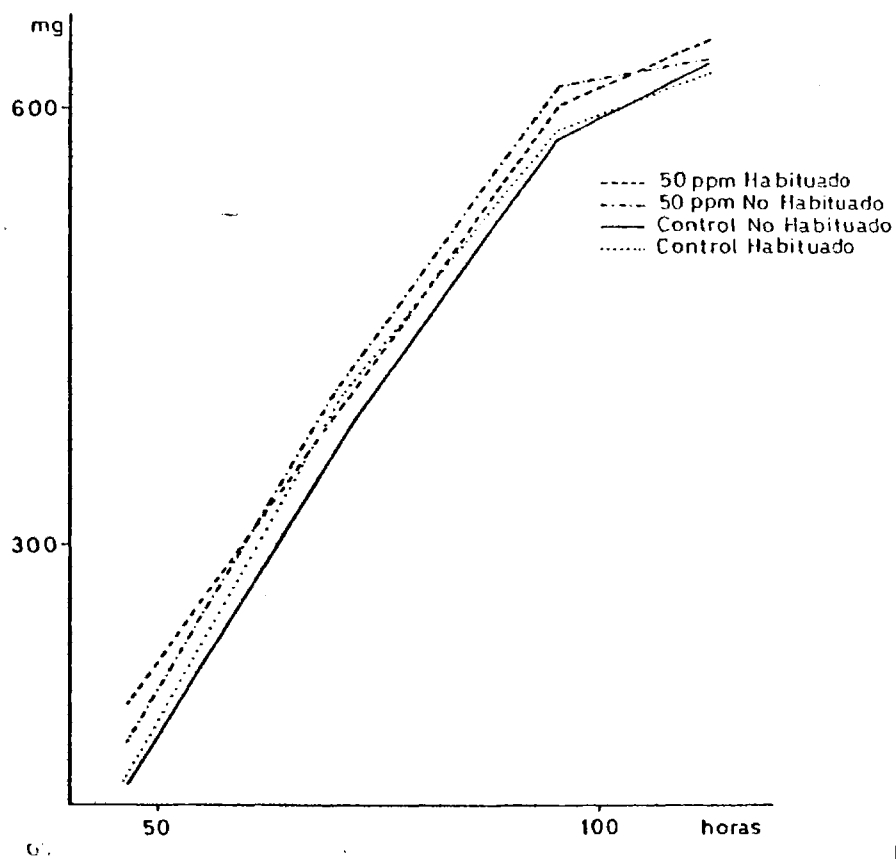


Fig. 20. Incidencia -estimada en términos de variación del peso seco de la biomasa- de 50 ppm de Aroclor - 1260 sobre el desarrollo de células de *S. cerevisiae*, partiendo de inóculos "habitados" y "no habitados" a la presencia del xenobiótico, en medio etanolado al 2%.

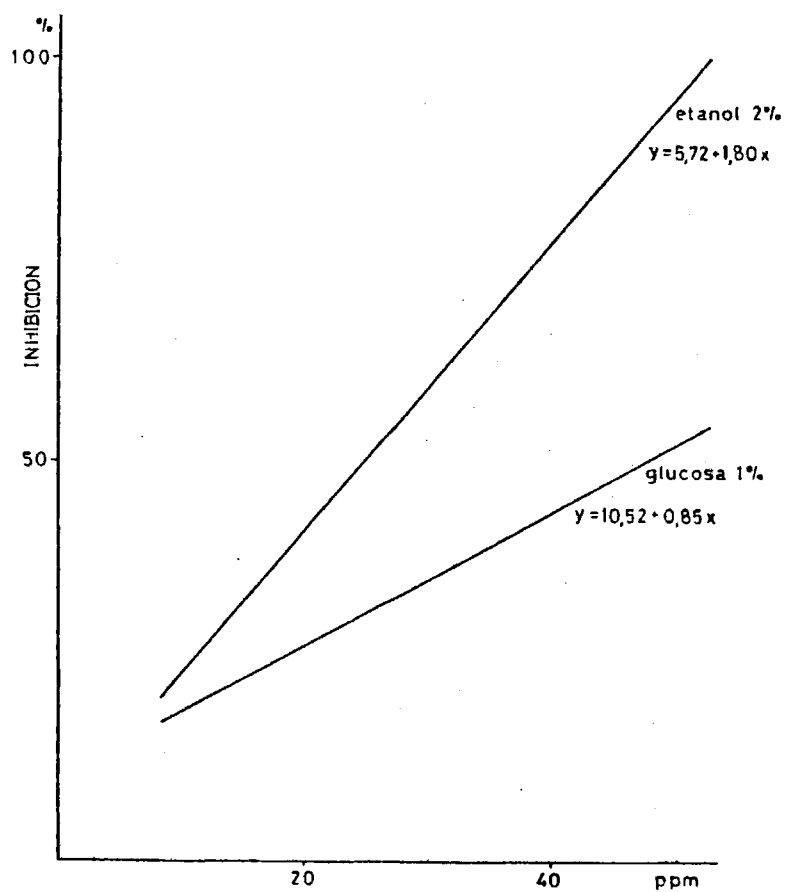


Fig. 21. Correlaciones dosis-respuesta en cultivos tratados con Aroclor 1232. Coeficiente de correlación 0,84 para cultivos glucosados al 1% y 0,94 para los etanolados al 2%.

4. RESPUESTA DE *Saccharomyces cerevisiae* A LA PRESEN-
CIA DE PCBs INDIVIDUALES.

Continuando la pauta seguida en el capítulo anterior, la respuesta de la levadura a la adición de PCBs individuales se evalúa en términos de variación de biomasa.

Los PCBs utilizados, -en concentraciones de 25 ppm todos ellos- fueron 2,2'-diclorobifenilo; 2,4'-diclorobifenilo; 2,5,2'-triclorobifenilo y 2,5,2',5'-tetroclorobifenilo, que designamos A, B, C y D respectivamente, -originan los efectos que es factible observar en la figura 22. De su observación se deduce que dos de los componentes ensayados, -los designados A y C- estimulan ligeramente el crecimiento de biomasa, pero el efecto es tan pequeño que no sería erróneo estimar como poco perceptible la incidencia de dichos compuestos en el desarrollo de *S. cerevisiae*, dado lo exiguo de las diferencias de biomasa. Por otra parte, el compuesto D dá lugar a una exaltación de la biomasa formada que se estima del orden del 20%.

Sin embargo, el compuesto B promueve una significativa inhibición en el crecimiento de la biomasa, evaluándose en torno al 12% respecto a la proporcionada por los cul-

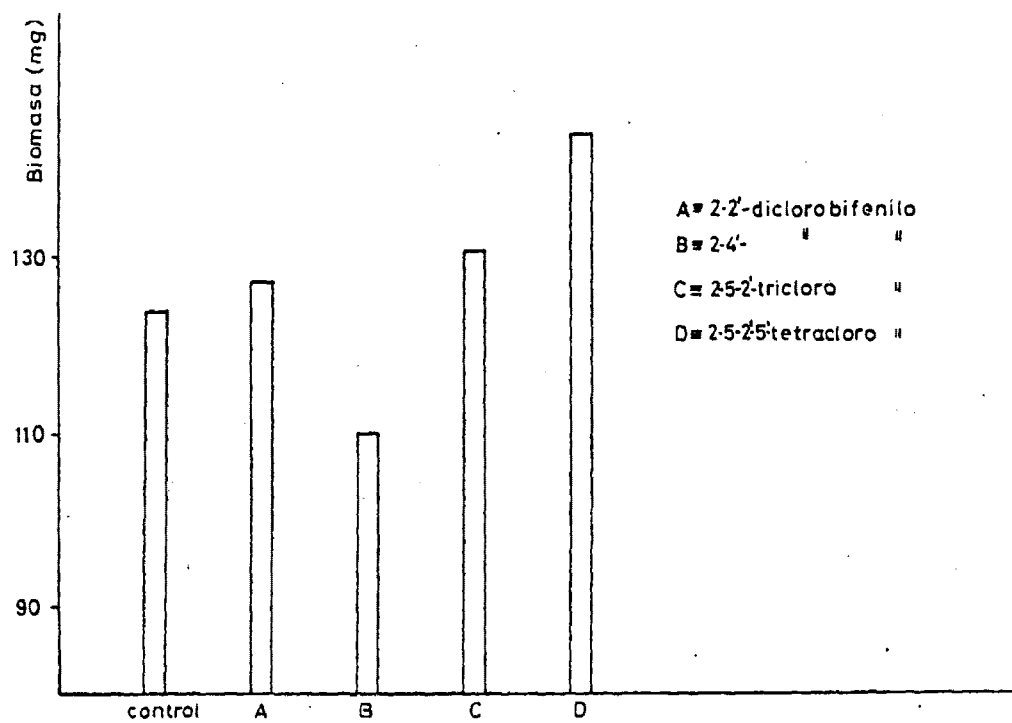


Fig. 22. Incidencia de 25 ppm de diferentes compuestos individuales de PCBs sobre el desarrollo de *S. cerevisiae* en medio etanolado al 2 %.

tivos control. En todos los casos las determinaciones se realizan una vez que han concluido los períodos de incubación. No es sorprendente el hecho de que el bifenilo triclorado - C no comporte oscilaciones drásticas de la biomasa, ya que ello se correlaciona con lo expuesto en anteriores capítulos en el sentido de que los PCBs más clorados - son los que menores efectos ocasionan. Resulta significativo, por el contrario, el hecho de que los bifenilos diclorados el A y el B, que solo difieren en la posición de un átomo de cloro, incidan de forma tan distinta en el comportamiento de *S. cerevisiae*, ya que el primero se revela inocuo para el desarrollo del ascomiceto, mientras que el segundo conlleva un apreciable descenso de la biomasa.

5. ACUMULACION DE PCBs EN *Saccharomyces cerevisiae*

Profundizando en el estudio de la incidencia de los PCBs sobre *S. cerevisiae*, vamos a referirnos ahora al proceso de acumulación de los contaminantes que están siendo investigados, por parte de la levadura.

En primer lugar, se ha constatado en todos los casos la existencia de un proceso de acumulación, ya que al término de los períodos de incubación el xenobiótico añadido prácticamente ha desaparecido de los medios de cultivo, estando todo él incorporado a las células de *S. cerevisiae*. En la figura 23, se recoge la evolución del proceso de acumulación en medios no fermentables (2% de etanol) a los que se han adicionado 5, 10, 25 y 50 ppm de los Arocloros 1232, 1242 y 1248. Como se observa, existe una acumulación preferencial del Aroclor 1232 respecto a los otros dos tipos de contaminantes ensayados, es decir, existe una correlación entre concentración en la levadura y disminución del porcentaje de cloración del PCBs. También merece destacarse el hecho de que en valores absolutos, los niveles de PCBs en las células de la levadura en las primeras etapas de la vida del cultivo, son superiores a los que se alcanzan al final de la fase estacionaria, lo cual debe interpretarse en

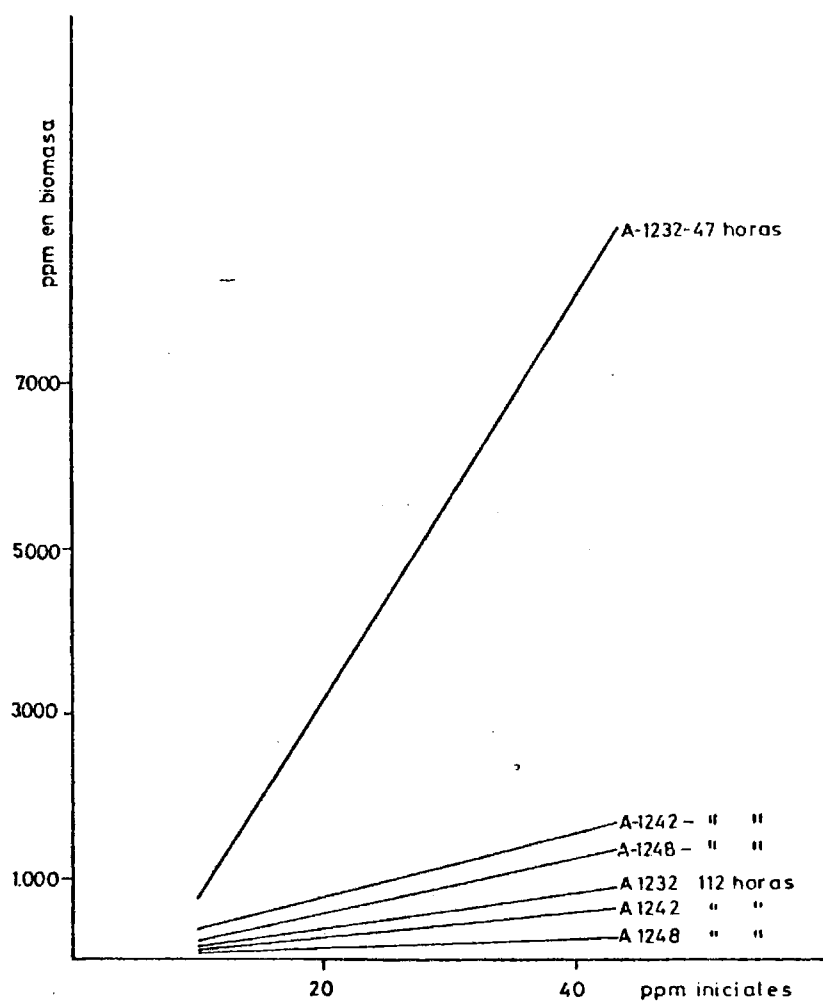


Fig. 23. Relación, en función del tiempo, entre niveles de diferentes Arocloros añadidos al medio inicialmente y los encontrados en la biomasa (medio etanolado al 2%).

el sentido de que el xenobiótico es acumulado rápidamente por la biomasa en crecimiento en las primeras horas del desarrollo, mientras que en las horas finales, el Aroclor ya incorporado, practicamente en su totalidad, se reparte en toda la biomasa, al ser los valores de ésta crecientes. Es importante reseñar la elevada capacidad de concentración que presenta el Aroclor 1232 en las etapas precoces del crecimiento, que logicamente es tanto más acusada cuanto mayor es el contaminante añadido.

Así pues, el proceso de acumulación depende en primer lugar de la edad del cultivo (todos los valores proporcionados por cualquier Aroclor a cualquier concentración son superiores a las 47 horas que a las 12 horas) y en segundo término del tipo de Aroclor adicionado.

En la figura 24 se comparan los histogramas correspondientes a los valores reales y a los valores medios de xenobiótico acumulado por mg de biomasa que se desprenden de la adición de 5, 10, 25 y 50 ppm de los Arocloros 1232 y 1248 a un cultivo en medio fermentable. Nuevamente se constata la relación existente entre acumulación y cloración del PCB de forma que el menos clorado es el que más se acumula. Asimismo es factible comprobar que las concentraciones de 5,

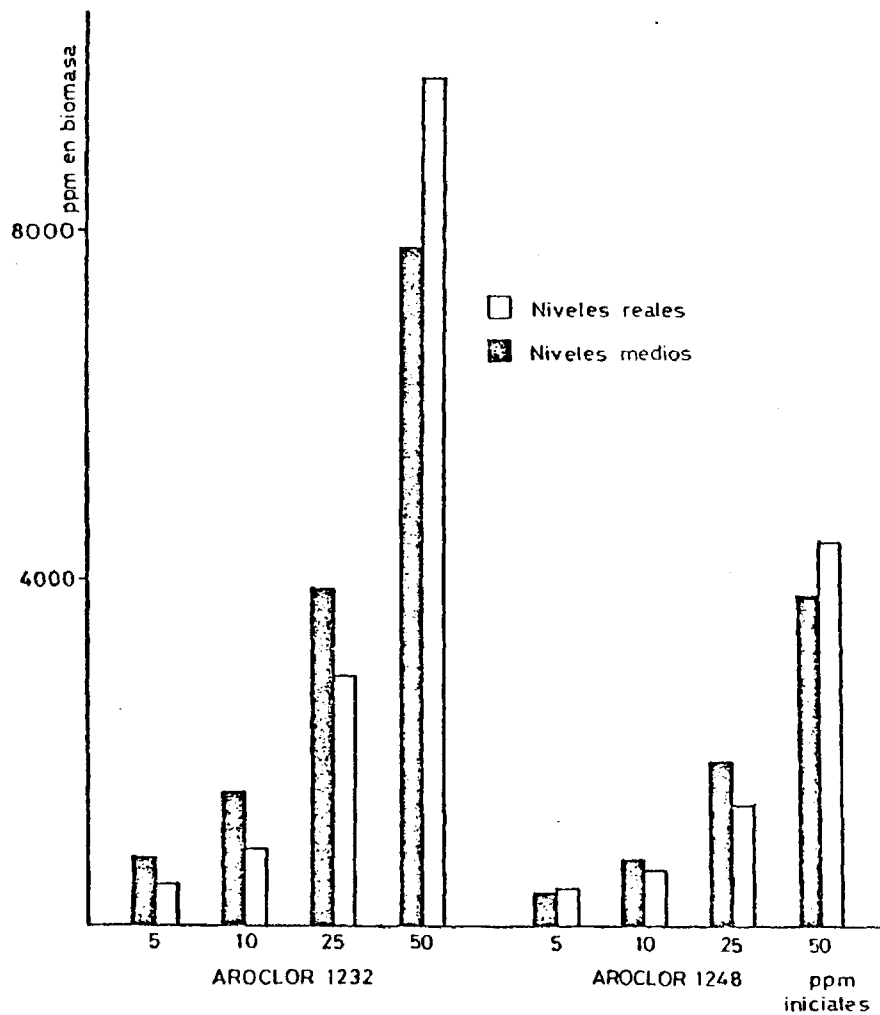


Fig. 24. Comparación entre los niveles reales y medios de Aroclor 1232 y 1248 acumulados por *S. cerevisiae*, resultantes de la presencia de diferentes concentraciones de los xenobióticos en medios glucosados al 1%.

10, y 25 ppm comportan niveles inferiores a los teóricos, mientras que, en otros casos la adición de 50 ppm se traduce en niveles de acumulación superiores a los que se esperaban. Es pues posible afirmar que a la concentración más elevada el xenobiótico se acumula en las células de *S. cerevisiae* a más alto nivel que a concentraciones inferiores.

En las figuras 25 y 26 se trazan las rectas que se obtienen después de relacionar las concentraciones iniciales del xenobiótico adicionado al medio con las ppm detectadas en la biomasa al final de los medios de cultivo. Se deduce que, confirmando lo expuesto, el Aroclor 1232 es el que se acumula más intensamente, existiendo una notable diferencia respecto al resto de los Arocloros ensayados. Sin embargo, cuando las concentraciones iniciales son bajas (5 ppm) todos los Arocloros son concentrados a niveles sensiblemente equivalentes; a partir de 10 y 25 ppm comienzan a establecerse sustanciales diferencias que son máximas cuando la cantidad de xenobiótico añadido es de 50 ppm. Merece destacarse, asimismo, el hecho de que el proceso de acumulación es significativamente más intenso en los casos en que el medio es fermentable que cuando no lo es.

Con objeto de poner de manifiesto las diferencias encontradas, se determinó el factor de bioconcentración de

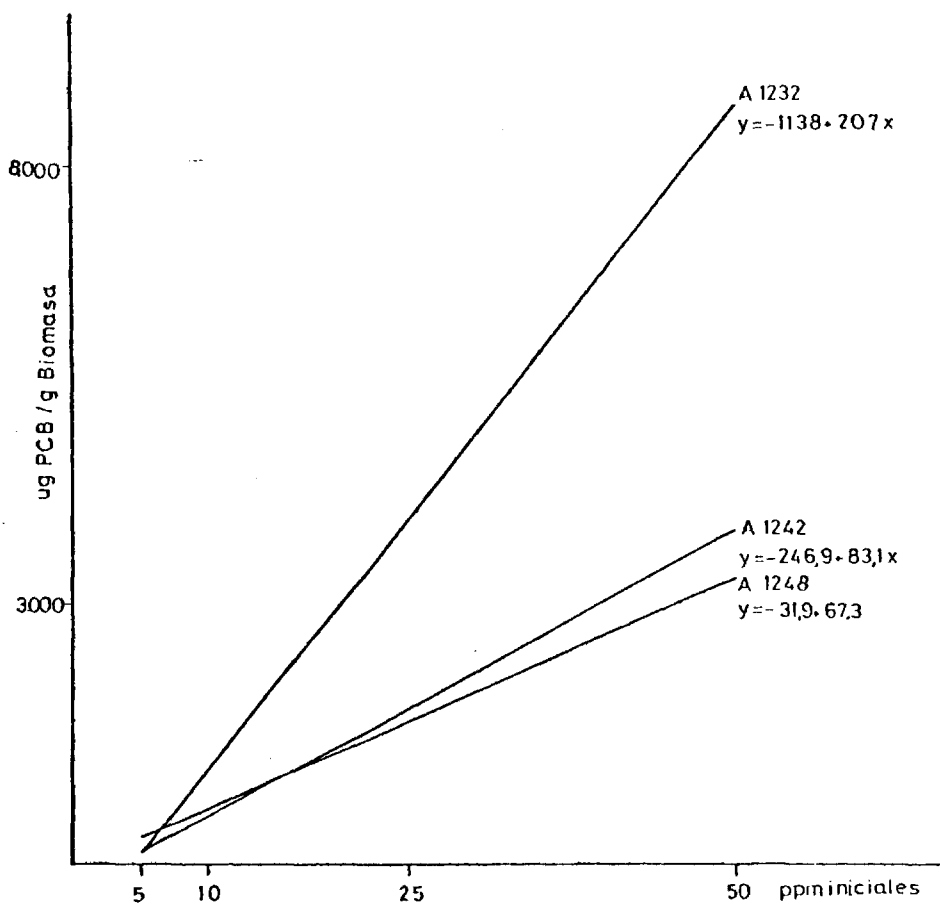


Fig. 25. Relación entre ppm iniciales añadidas al medio y ppm detectadas en la biomasa de *S. cerevisiae*, desarrollada en presencia de diferentes Aroclor en medio glucosado al 1%. Coeficientes de correlación: 0,97; 0,98 y 0,99 para los Aroclor 1232, 1242 y 1248 respectivamente.

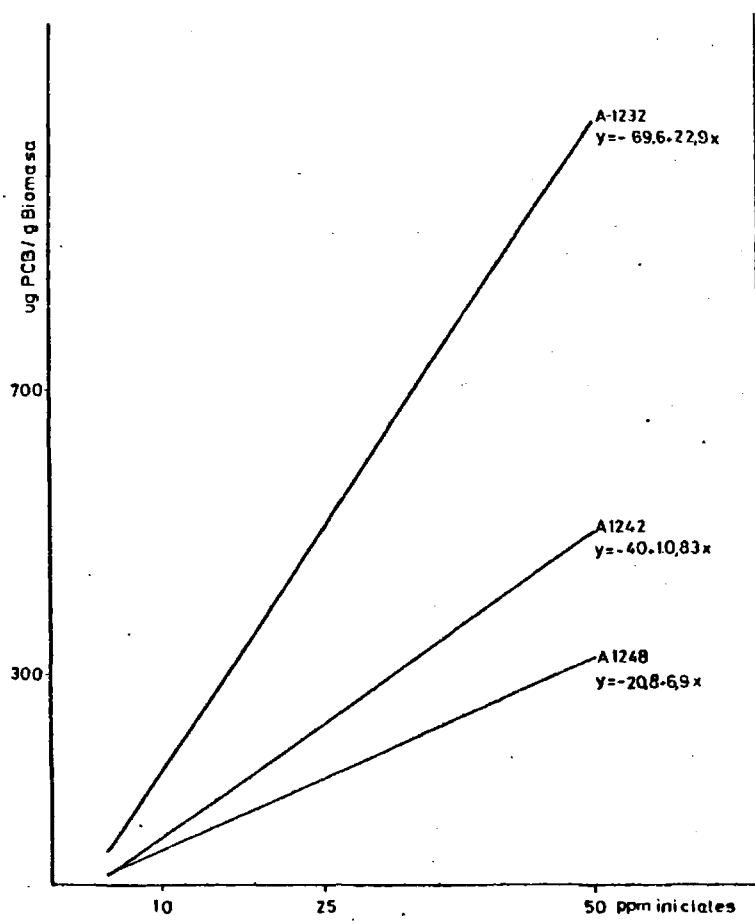


Fig. 26. Relación entre ppm iniciales añadidas al medio y ppm detectadas en la biomasa de *S. cerevisiae*, desarrollada en presencia de diferentes Aroclorres en medio etanolado al 2%. Coeficiente de correlación: 0,99; 0,97 y 0,99 para los Aroclorres 1232, 1242 y 1248 respectivamente.

los diferentes Arocloros, a las distintas concentraciones utilizadas, en cultivos llevados a cabo en medio no fermentable. Los resultados, recogidos en la Tabla II, confirman lo ya expuesto, en el sentido de que el Aroclor 1232 es el que más se acumula durante todo el tiempo de cultivo, pero si bien a las 47 horas parece clara la influencia del grado de cloración, a las 112 horas las diferencias se han hecho mínimas, posiblemente por el efecto de dilución de los contaminantes en la biomasa en crecimiento, en función del tiempo.

Es necesario destacar por último la incidencia de la concentración del Aroclor empleado en el proceso de bioconcentración, de forma que los mayores niveles de xenobiótico adicionado comportan valores superiores de contaminante acumulado.

T A B L A I I

Factores de bioconcehtración de los diferentes Arocloros,
en medio etanolado al 2%

Aroclor	Concentración en el medio (ppm)	Factores de bioconcentración	
		47 horas	112 horas
1232	5	28,3	15,0
1232	10	50,9	11,6
1232	25	148,2	20,8
1232	50	214,8	21,5
1242	5	20,4	8,3
1242	10	38,8	9,0
1242	25	41,1	9,2
1242	50	30,0	14,0
1248	5	19,4	6,8
1248	10	27,0	8,7
1248	25	20,0	9,6
1248	50	38,0	7,0
1254	5	31,8	10,8
1254	10	40,4	11,1
1254	25	48,8	11,6
1254	50	102,7	14,6

6. NATURALEZA DE LOS PROCESOS DE ACUMULACION DE LOS
PCBs EN *Saccharomyces cerevisiae*.

La naturaleza del proceso de acumulación comporta dos tipos de mecanismos a través de los cuales pueden concentrarse los PCBs en la levadura, uno que vendría determinado por procesos pasivos de adsorción a la superficie celular y reparto agua/lípidos celulares, y un segundo mecanismo por transporte activo, que implica un aporte energético por parte de la célula.

Se llevaron a cabo series de cultivos en medio fermentable y se detuvieron estos a las 52 horas por esterilización y muerte de las células. Los medios que contienen las células muertas se dosificaron con 5, 10 y 25 ppm de Aroclor 1242, manteniendo el contacto durante 16, 22 y 40 horas. Una vez transcurrido este tiempo se determinó la concentración de xenobiótico por mg de biomasa en cada uno de los casos. Paralelamente se efectuaron cultivos de levadura con el mismo Aroclor y a las mismas concentraciones, realizando una de las tomas a las 52 horas con objeto de que coincidiera la edad de este cultivo con la de los correspondientes a las células muertas. Los resultados obtenidos respecto a la cantidad de xenobiótico acumulado

en ambos casos se recogen en la Tabla III. Quedó ya sen-
tado el proceso de acumulación de los PCBs por las células
vivas de *S. cerevisiae*. En dicho proceso, en el caso de -
células muertas, se aprecia que la cantidad de xenobiótico
acumulado no depende del tiempo que dichas células permane-
cen en contacto con el mismo y que los niveles de acumula-
ción son análogos a los alcanzados por el microorganismo -
vivo a las 52 horas de cultivo, por lo que se deduce que -
dicho nivel se alcanza independientemente de que se trate
de células vivas o muertas. Esto se ve apoyado por los re-
sultados que se reflejan en la figura 27 al relacionar la -
acumulación relativa (expresada en $\mu\text{g/g}$ de biomasa) en-
contrada en cada caso con un índice *I* que resulta de mul-
tiplicar el porcentaje de cloración de cada Aroclor por su
concentración en el medio. Esta correlación, tanto en medio
fermentable como no fermentable, pone de manifiesto que las
concentraciones detectadas (cuando todos los cultivos se
encuentran en las proximidades del máximo de biomasa y los
niveles de bioconcentración de xenobiótico se han estabili-
zado) se hallan linealmente correlacionadas con el índice
"I" (grado de significación superior al 99%).

A la vista de estos resultados no parece que exista

T A B L A I I I

Niveles de acumulación del A-1242, a diferentes concen-
traciones iniciales y tiempos de cultivo, en células vivas
y muertas de S. cerevisiae en medio no fermentable.

(Etanol 2%)

<u>Edad cultivo</u> <u>(horas)</u>	<u>Concentraciones</u> <u>iniciales en el</u> <u>medio (ppm)</u>	<u>Concentraciones en la</u> <u>biomasa (ppm)</u>
40	5	131,4
40	10	200,18
40	25	807,20
52	5	49,62
52	10	298,54
52	25	629,76
76	5	17,4
76	10	130,14
76	25	325,96

T A B L A III (continuación)

Niveles de acumulación del A-1242, a diferentes concentraciones iniciales y tiempos de cultivo, en células vivas y muertas de *S. cerevisiae* en medio no fermentable. (Etanol 2%)

<u>Edad cultivo</u> <u>(horas)</u>	<u>Concentraciones iniciales</u> <u>en el medio (ppm)</u>	<u>Tiempo de contacto</u> <u>(horas)</u>	<u>Concentraciones en</u> <u>la biomasa (ppm)</u>
52	5	16	74,02
52	10	16	260,09
52	25	16	626,55
52	5	22	88,72
52	10	22	280,31
52	25	22	661,71
52	5	40	17,4
52	10	40	130,14
52	25	40	325,96

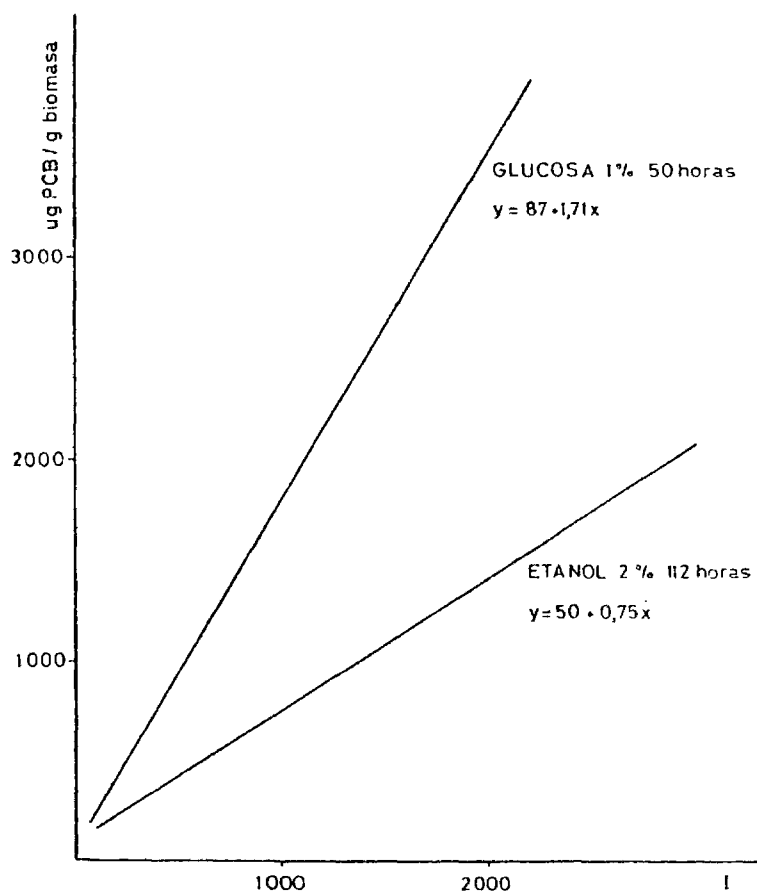


Fig. 27. Relación entre acumulación relativa ($\mu\text{g/PCB/g}$ biomasa) e índice I en células de *S. cerevisiae* cultivadas en medio glucosado y etanolado. Coeficiente de correlación en ambos casos 0,99.

contribución manifiesta de un mecanismo metabólicamente - activo en el proceso de bioconcentración y si parece apropiado atribuirlo únicamente a los mecanismo pasivos constatados. Se tratará ahora de analizar la aportación tanto de la simple adsorción a las paredes celulares como de los mecanismos de reparto agua/lípidos celulares, procesos ambos implicados en los mecanismos pasivos de acceso a la célula de los PCBs.

Para cuantificar la cantidad de Aroclor adsorbida se realizaron series de cultivos en 220 ml de medio líquido no fermentable, suplementado con 5 y 25 ppm de A-1242 y A-1260 y una vez separadas las células del medio por centrifugación, se lavan a temperatura ambiente y con agitación cuatro veces consecutivas con 25 ml de H₂O destilada cada una, por un tiempo total de dos horas, con lo cual debe separarse o desorberse una parte o el total de la fracción del xenobiótico concentrado por adsorción (Voerman, 1969). Las diferencias entre las cantidades de PCBs encontradas después de someter las células al proceso descrito se recogen en la Tabla IV, y de su observación se desprende que la contribución debida a la adsorción en el proceso acumulativo de los PCBs representa un promedio calculado alrededor del 20%, si bien debe considerarse que el porcentaje de Aroclor desor-

T A B L A I V

Cantidades de Aroclor acumuladas en células lavadas y sin lavar de *S. cerevisiae* en cultivos con
medios etanolados al 2%

<u>Aroclor</u>	<u>Concentración en el medio inicial (ppm)</u>	<u>Edad cultivo (horas)</u>	<u>Células sin lavar</u>		<u>Células lavadas</u>		<u>Desorbido %</u>
			<u>Biomasa (mg)</u>	<u>Aroclor acumulado (ppm)</u>	<u>Biomasa (mg)</u>	<u>Aroclor retenido (ppm)</u>	
Control	0	48	150,8	-	-	-	-
1242	5	"	152,3	221,7	136,3	186,9	14,8
1260	5	"	154,9	207,4	129,8	165,5	20,2
Control	0	48	150,8	-	-	-	-
1242	25	"	152,9	1472,7	140,3	1260,0	12,2
1260	25	"	156,1	2295,4	140,2	1670,0	27,2
Control	0	92	341,1	-	-	-	-
1242	5	"	353,6	104,39	343,4	81,0	19,5
1260	5	"	346,8	145,8	331,2	98,9	32,2
Control	0	92	341,1	-	-	-	-
1242	25	"	384,9	607,2	347,7	525,9	13,3
1260	25	"	367,1	1036,0	335,5	727,5	29,8

bido aumenta con el grado de cloración del mismo, disminuyendo al aumentar la concentración del xenobiótico añadido al medio.

Por otra parte, en los trabajos de Tejedor (1977), realizados en este mismo laboratorio, se demostró que en los cultivos en medio líquido de *S. cerevisiae*, dosificados con distintas concentraciones de varios Arocloros, las concentraciones de éstos halladas en el material biológico y en el medio, después de alcanzado el equilibrio, satisfacen con un significativo grado de ajuste la ecuación de Freundlich.

Los resultados encontrados son altamente coherentes con la hipótesis de que en el proceso de bioconcentración de los PCBs, el coeficiente de reparto agua/lípidos constituye otro factor de importante significación -coincidiendo en ello con la idea apuntada por Urey (1976)- y es probablemente por ello que, dada la elevada lipofilia de los PCBs en general, no existan diferencias detectables en la acumulación de los distintos componentes de un Aroclor determinado, como se vió en el capítulo anterior.

7. INCIDENCIA DE LOS PCBs SOBRE LA FRACCION LIPIDICA
DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Puesta de manifiesto la influencia de los PCBs en el desarrollo de la biomasa de *S. cerevisiae*, se estudió la - posible variación de la fracción lipídica en función de la presencia de dicho xenobiótico, dado que dicha fracción lipídica es parte integrante de la biomasa,

En primer lugar, se llevaron a cabo cultivos control -sin adición de xenobiótico- en medios fermentable y no fermentable, efectuándose diferentes medidas a lo largo de todo el período de incubación; los resultados, resumidos en la - figura 28, permiten deducir que el contenido total de lípidos aumenta con el tiempo, manteniendo una cierta analogía con las curvas obtenidas para el crecimiento de la biomasa. En las primeras horas de cultivo, los niveles de lípidos detectados en medio fermentable son ligeramente superiores a los obtenidos en medio no fermentable, igualándose ambos al rededor de las 65 horas de cultivo (momento en el que la - levadura en medio glucosado se encuentra en la fase de decaimiento y en medio etanolado en la fase de crecimiento exponencial). A partir de este momento el contenido de la - fracción lipídica en medio no fermentable se incrementa pau-

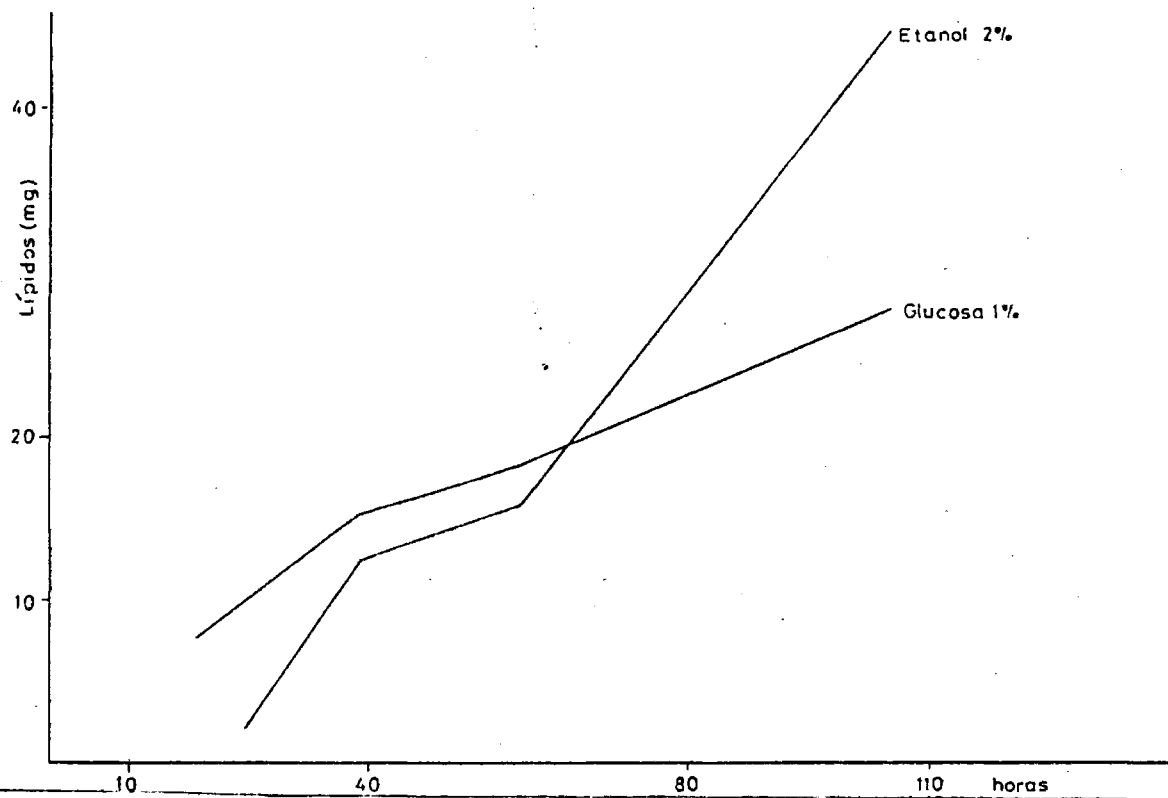


Fig. 28. Evolución de los niveles de lípidos totales, en función del tiempo, en medios glucosados y etanolados.

latinamente, llegando a ser a las 100 horas de cultivo un 40% superior al de los cultivos glucosados. Sin duda, influyen las distintas fuentes de carbono, y correlativamente, el que ambos cultivos se encuentran en diferentes etapas del desarrollo.

Asimismo, se ha determinado el porcentaje de lípidos respecto a la biomasa total; los niveles encontrados representan un 15% del peso seco de la masa celular, lo que coincide básicamente con los datos aportados por Rouser (1967).

En las Tablas IV y VI se recogen los resultados obtenidos en cuanto al contenido de lípidos de la levadura, evaluados en los cultivos control y tratados con 50 ppm de los Arocloros 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260, en medio fermentable y no fermentable. En las figuras 29 y 30 se representan dichos resultados. La comparación permite constatar la similitud existente con los resultados obtenidos en el caso de la biomasa en presencia de los distintos Arocloros. Así, se pone de manifiesto que en medio fermentable la cantidad de lípidos detectados en cultivos suplementados con xenobiótico es siempre inferior a los cultivos control, siendo el A-1232, seguido del A-1242, el que deprime, de manera más significativa, los niveles de lípidos

totales; el A-1248, que en las primeras horas de cultivo presenta una inhibición mínima, se va acentuando a lo largo del período de incubación para llegar al final a un grado de inhibición análogo al A-1232 y A-1242, aunque siempre por debajo de éstos. Al igual que en el caso del desarrollo de la biomasa, el A-1254 y A-1260 son los que producen una inhibición menos significativa, obteniéndose unos niveles de lípidos similares al control, aunque inferiores a éste. En el caso de los cultivos en medio fermentable, los resultados siguen siendo muy semejantes a los obtenidos con respecto al crecimiento de la biomasa de las levaduras, ya que desde las primeras etapas del cultivo, - los Arocloros 1248, 1254 y 1260, y precisamente por éste orden, superan los niveles alcanzados por el control; es decir, parece que estimulan -aunque no significativamente- la síntesis de lípidos por las células de la levadura, mientras que los Arocloros 1232 y 1242 ocasionan una depresión de los mismos, aunque en menor grado que en el caso anterior.

En consecuencia, en medio fermentable todos los Arocloros deprimen los niveles de lípidos totales, mientras que en medio no fermentable, los Arocloros 1248, 1254 y 1260 producen una ligera estimulación sin que se detecten efectos muy significativos en el incremento de los lípidos,

T A B L A V

Contenido lipídico en mg de cultivos de S. cerevisiae -
adicionados con 50 ppm de diferentes Arocloros en medio
glucosado al 1%.

<u>Aroclor</u>	<u>Tiempo de cultivo</u> <u>(horas)</u>	<u>Lípidos totales</u> <u>(mg)</u>	<u>% Lípidos</u> <u>Biomasa total</u>
Control	15	9,42	6,33
1232	15	4,16	4,13
1242	15	6,83	5,13
1248	15	9,29	6,05
1254	15	9,70	5,96
1260	15	9,20	5,54
Control	22	16,03	7,28
1232	22	10,82	5,66
1242	22	12,30	6,00
1248	22	15,50	7,09
1254	22	14,00	6,23
1260	22	14,50	6,53
Control	28	22,54	7,68
1232	28	16,07	6,53
1242	28	18,00	6,72
1248	28	18,50	6,20
1254	28	21,10	7,14
1260	28	21,50	7,44
Control	40	22,74	8,00
1232	40	19,80	7,22
1242	40	20,10	6,93
1248	40	20,30	6,91
1254	40	21,40	7,48
1260	40	21,50	9,59

T A B L A VI

Contenido lipídico en mg de cultivos de S. cerevisiae -
adicionados con 50 ppm de los diferentes Arocloros en me-
dio etanolado al 2%.

<u>Aroclor</u>	<u>Tiempo de cultivo</u> <u>(horas)</u>	<u>Lípidos totales</u> <u>(mg)</u>	<u>% Lípidos</u> <u>Biomasa total</u>
Control	46	7,58	6,76
1232	46	-	-
1242	46	6,41	7,12
1248	46	10,29	6,53
1254	46	10,36	6,67
1260	46	10,55	7,50
Control	70	26,86	11,29
1232	70	-	-
1242	70	26,17	10,20
1248	70	35,59	11,64
1254	70	29,73	10,02
1260	70	32,04	10,68
Control	94	44,50	10,64
1232	94	40,05	12,28
1242	94	42,18	10,24
1248	94	-	-
1254	94	52,74	12,16
1260	94	46,73	9,53
Control	142	73,00	15,81
1232	142	71,30	14,57
1242	142	72,69	15,85
1248	142	82,94	16,95
1254	142	80,63	16,67
1260	142	78,35	15,94

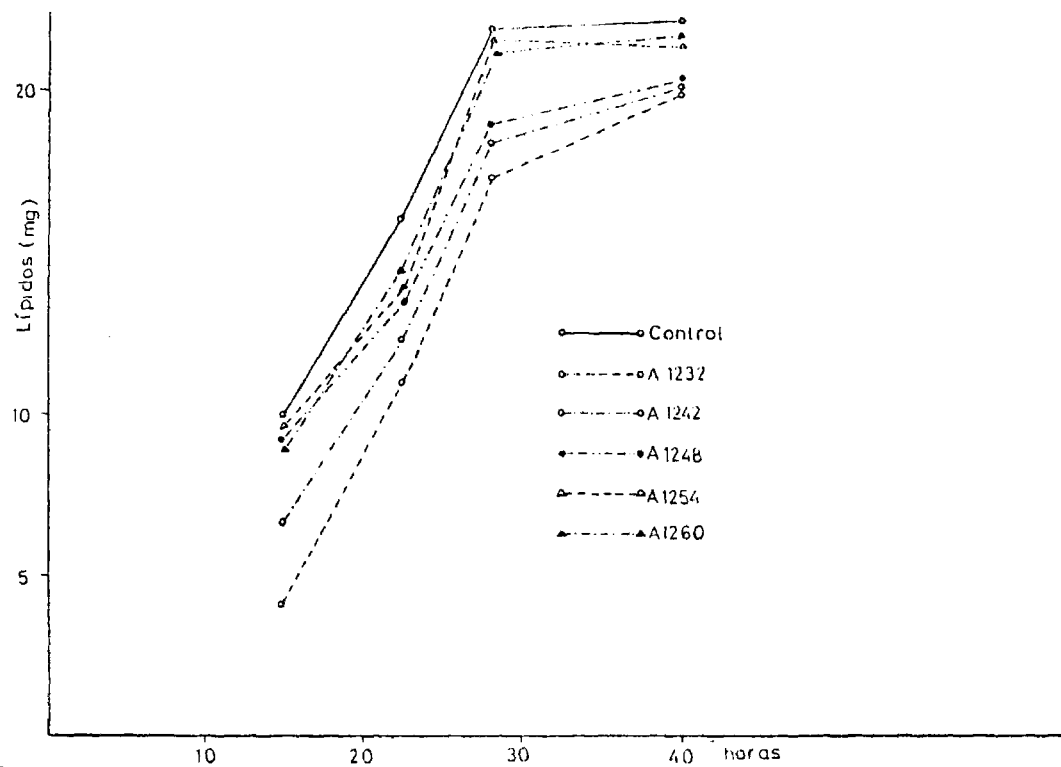


Fig. 29. Evolución de los niveles de lípidos totales, en función del tiempo, en medios glucosados adicionados con 50 ppm de diferentes Aroclores.

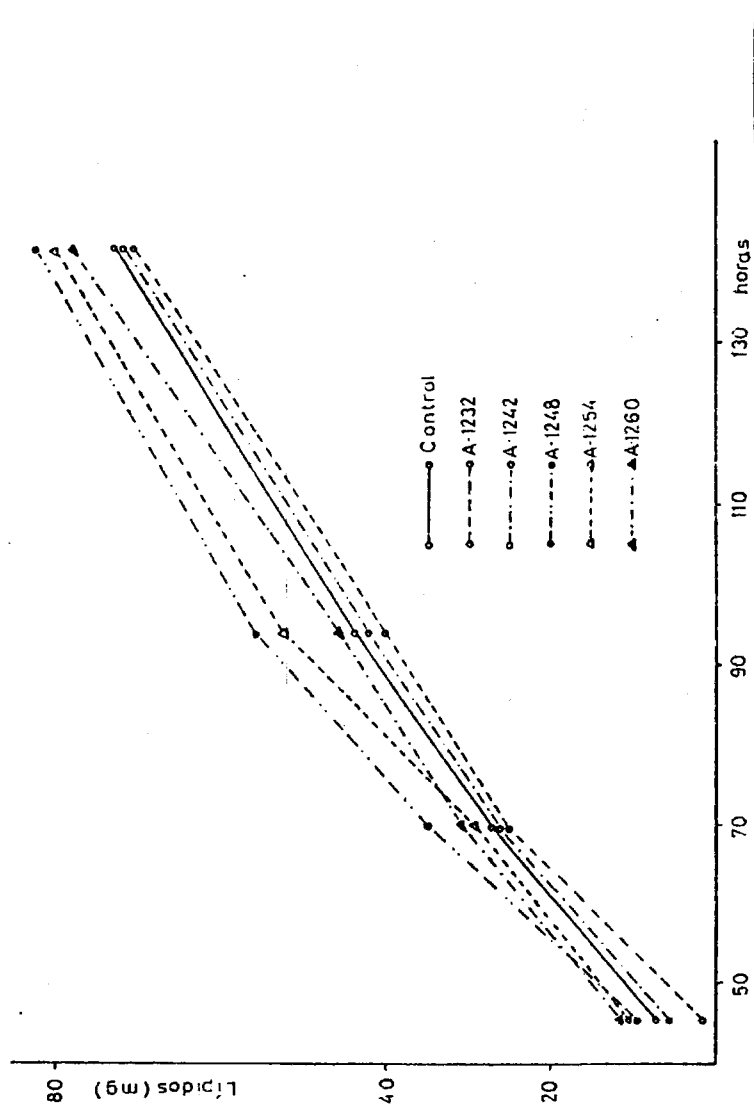


Fig. 30. Evolución de los niveles de lípidos totales, en función del tiempo, en medios etanolados adicionados con 50 ppm de diferentes Arocloros.

lo cual está de acuerdo con lo encontrado en la interacción de los mismos PCBs en la síntesis lipídica en *E. Coli* - (Greer, 1974) y con el efecto, poco significativo estadísticamente, que el tratamiento con PCBs "in vivo" produce sobre la actividad de cuatro enzimas microsomales responsables de la biosíntesis de lípidos en hígado de ratas (Holub, - 1975).

Determinadas las cantidades de lípidos totales, se juzgó de interés evaluar la influencia particularizada que sobre los fosfolípidos ejercen dichos bifenilos policlorados, dada la relación de orden estructural de estos compuestos en el contexto celular. Se llevó a cabo valorando los niveles de fósforo en la fracción lipídica, habida cuenta su interrelación con los fosfolípidos existentes.

La variación de los niveles de fósforo en medio fermentable y no fermentable, a lo largo del período de incubación en cultivos control, se resume en la figura 31, donde se refleja que, de un modo muy similar en ambos casos, los valores máximos se registran en las primeras etapas de cultivo, tendiendo gradualmente a alcanzar un nivel de estabilización a medida que aumenta el número de horas de cultivo y, por consiguiente, la biomasa, siendo los niveles de --

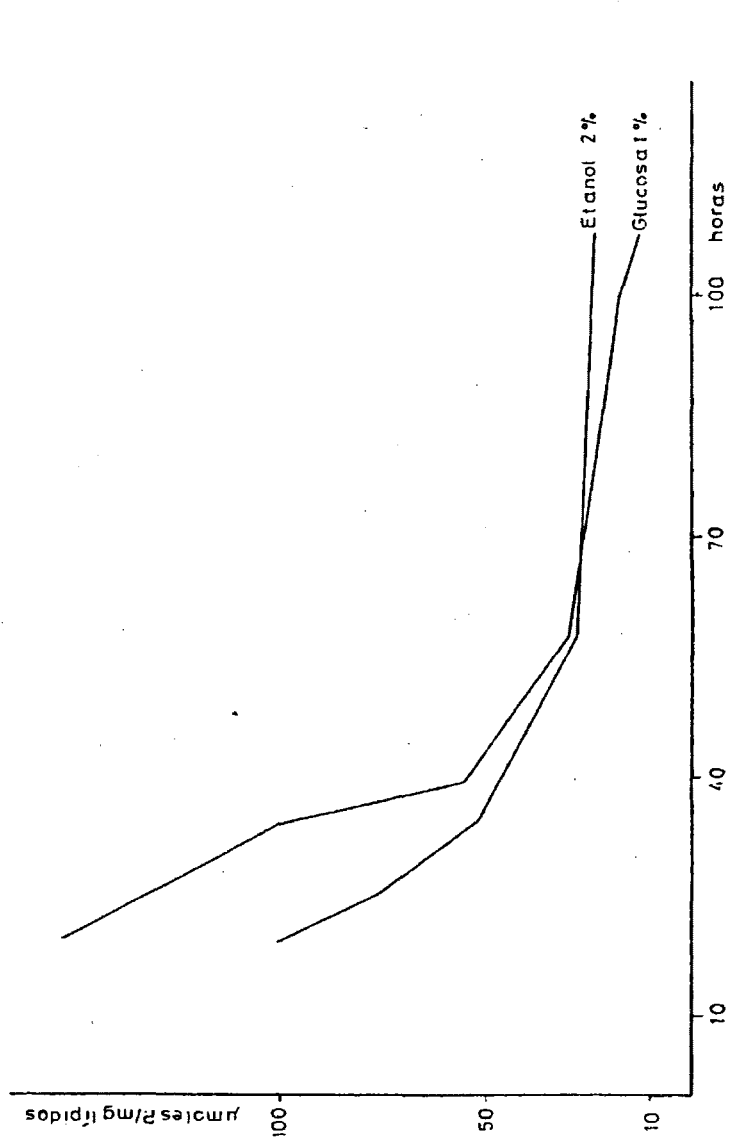


Fig. 31. Evolución de los niveles de fósforo, en función del tiempo, en cultivos glucosados y etanolados.

fosfolípidos superiores en medio glucosado durante las primeras horas de cultivo, igualándose alrededor de las 70 horas y superiores hacia las 100 horas en el medio no fermentable.

En la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos en dos series de cultivos en medios con glucosa y etanol, ambas en presencia de A-1254, los cuales quedan reflejados en la figura 32. Se puede observar la incidencia del Aroclor a diferentes concentraciones iniciales de 10, 25 y 50 ppm, poniéndose de manifiesto la depresión ocasionada por el xenobiótico en todas las etapas de cultivo de una manera regular y en orden creciente a la concentración del mismo, alcanzando los menores niveles con 50 ppm de A-1254 tanto en medio glucosado como etanolado.

T A B L A VII

Niveles de fósforo (μ moles) por mg de lípidos, encontrados en las células de *S. cerevisiae* adicionadas con diferentes concentraciones de Aroclor 1254 en medio glucosado y etanolado.

<u>Medio de Cultivo</u>	<u>Concentración Aroclor (ppm)</u>	<u>Edad Cultivo (horas)</u>	<u>moles P mg lípidos</u>
Glucosa 1%	0	14	82,52
	10	"	77,21
	25	"	76,50
	50	"	75,02
	0	22	64,52
	10	"	62,51
	25	"	62,03
	50	"	60,15
	0	44	52,13
	10	"	51,80
	25	"	50,52
	50	"	49,89
Etanol 2%	0	44	39,92
	10	"	44,83
	25	"	38,21
	50	"	36,19
	0	70	22,18
	10	"	32,37
	25	"	21,50
	50	"	18,86
	0	110	11,00
	10	"	-
	25	"	9,64
	50	"	8,22

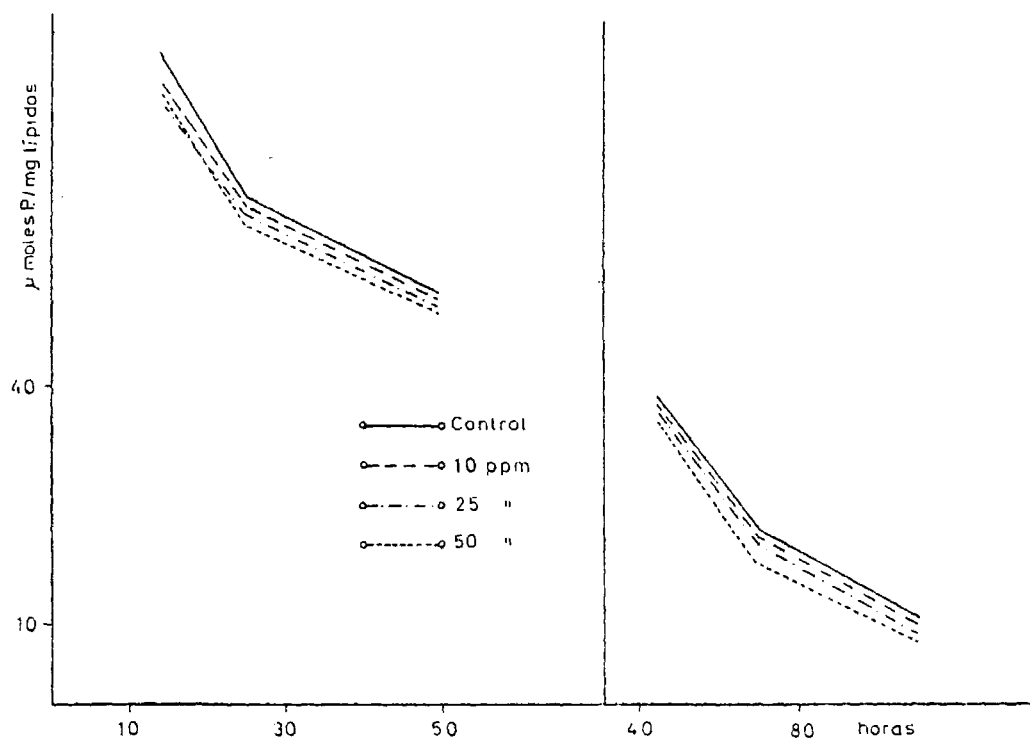


Fig. 32. Evolución de los niveles de fósforo, en función del tiempo, en cultivos glucosados (izquierda) y etanolados (derecha), adicionados con diferentes concentraciones de Aroclor 1254.

7.1. INCIDENCIA DE LOS PCBs SOBRE LOS ACIDOS GRASOS
INTEGRANTES DE LA FRACCION SAPONIFICABLE

Prosiguiendo el estudio de la fracción lipídica de *S. cerevisiae* se evaluó la subfracción saponificable, realizándose el análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos integrantes de dicha subfracción.

En la determinación cromatográfica de los ácidos grasos se pusieron de manifiesto los ya descritos en la bibliografía, como componentes de los lípidos de la levadura objeto de este estudio (Hunter, 1971). El ácido graso mayoritario encontrado es el palmitoléico ($C_{16:1}$), seguido por el oléico ($C_{18:1}$), palmítico (C_{16}), mirístico (C_{14}), esteárico (C_{18}), láurico (C_{12}), cáprico (C_{10}), caprílico (C_8), miristoléico ($C_{14:1}$) y el n-pentadecanóico (C_{15}), ordenados en orden decreciente según su contribución a la totalidad. En la figura 33, se recogen en forma de histogramas la participación porcentual de cada ácido graso a la totalidad de los integrantes de la fracción lipídica.

Como ya se ha comentado en el capítulo correspondiente de la parte experimental, la cuantificación de los ácidos grasos minoritarios, como el C_8 , $C_{14:1}$ y C_{15} planteó

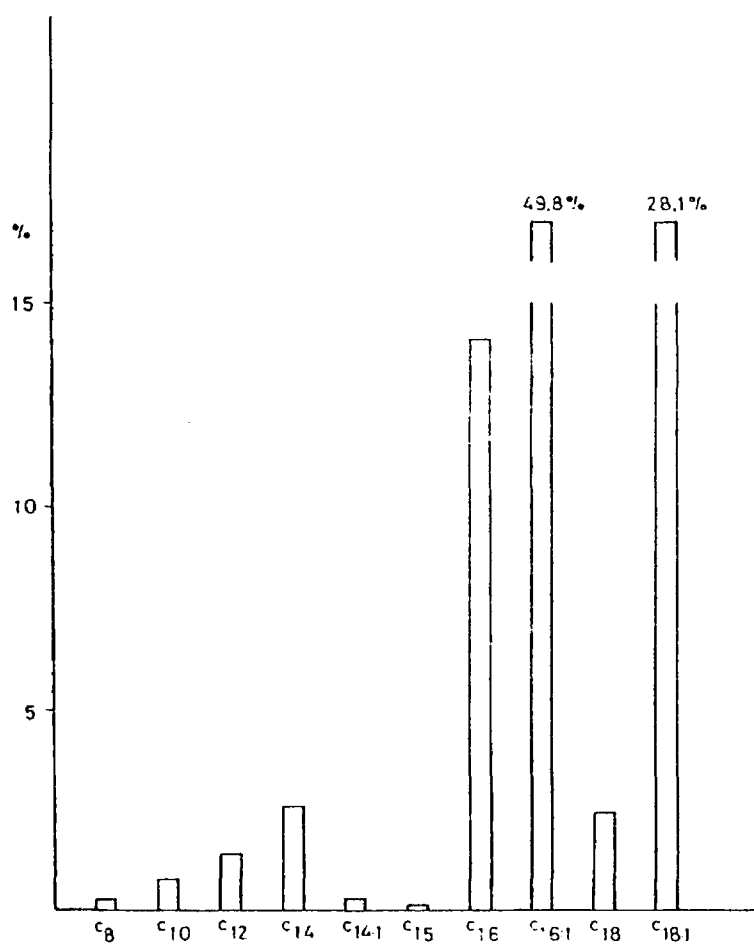


Fig. 33. Participación porcentual de cada ácido graso a la totalidad de los integrantes de la fracción lipídica de *S. cerevisiae*.

serias dificultades y los resultados que se obtuvieron estaban afectados por un error sistemático, por lo que, dado que en nuestro caso lo que se intentaba era estudiar la incidencia cuantitativa de los PCBs en la biosíntesis general de lípidos de la levadura, particularizándola a sus ácidos grasos fundamentales, se decidió tener en cuenta solo los componentes mayoritarios y aquellos que por su interés no ofrecieran dificultad en su cuantificación. Por lo tanto, los resultados que se exponen están basados en la variación cuantitativa de los ácidos grasos C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , $C_{16:1}$ y $C_{18:1}$.

Siguiendo la misma pauta que en los capítulos anteriores se llevaron a cabo las experiencias ya descritas para cuantificar la incidencia de los PCBs en función de la concentración y el grado de cloración. En las Tablas VIII IX , se recogen los resultados obtenidos de los diferentes ácidos grasos en cultivos adicionados con 10, 25 y 50 ppm de Aroclor 1254 en medios fermentable y no fermentable. En las figuras 34 y 35 se representan gráficamente dichos resultados.

La observación de ambas figuras pone de manifiesto que, la dinámica incidente de los PCBs sobre la biosíntesis

T A B L A VIII

Niveles de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) encontrados en las células de *S. cerevisiae* adicionadas con diferentes concentraciones de A-1254 en medio glucosado al 1%.

Concentración (ppm)	Tiempo de Cultivo (horas)	Acidos grasos $\mu\text{g}/\text{mg}$					
		<u>C₁₀</u>	<u>C₁₂</u>	<u>C₁₄</u>	<u>C₁₆</u>	<u>C_{16:1}</u>	<u>C_{18:1}</u>
Control	14	0,23	0,38	0,67	2,73	14,05	4,61
10	"	0,20	0,25	0,53	2,40	13,02	3,83
25	"	0,15	0,23	0,51	2,31	12,14	3,39
50	"	0,12	0,21	0,43	2,30	9,88	2,12
Control	22	0,31	0,42	0,79	3,64	16,19	5,67
10	"	0,30	0,39	0,70	3,42	14,05	4,93
25	"	0,25	0,33	0,67	3,21	13,33	4,35
50	"	0,22	0,32	0,63	3,11	11,93	3,46
Control	44	0,38	0,56	0,88	4,22	16,81	6,01
10	"	0,36	0,54	0,82	4,14	14,81	3,85
25	"	0,34	0,48	0,79	4,07	14,21	51,20
50	"	0,33	0,44	0,73	4,03	13,01	4,40

T A B L A IX

Niveles de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) encontrados en las células de *S. cerevisiae* adicionadas con diferentes concentraciones de A-1254 en medio etanolado 2%.

Concentración (ppm)	Tiempo de Cultivo (horas)	Ácidos grasos $\mu\text{g}/\text{mg}$					
		<u>C₁₀</u>	<u>C₁₂</u>	<u>C₁₄</u>	<u>C₁₆</u>	<u>C_{16:1}</u>	<u>C_{18:1}</u>
Control	44	0,27	0,83	1,02	3,51	9,21	3,86
10	"	0,28	0,83	1,02	3,58	9,31	3,96
25	"	0,28	0,84	1,02	3,83	9,61	4,06
50	"	0,28	0,84	1,02	3,98	9,91	4,15
Control	70	0,51	1,32	1,74	6,89	22,61	9,69
10	"	0,51	1,32	1,80	6,89	22,62	9,69
25	"	0,58	1,40	1,83	6,98	22,65	9,74
50	"	0,65	1,48	1,86	7,06	22,71	9,82
Control	110	0,69	1,48	1,86	7,21	22,80	9,91
10	"	0,68	1,51	1,82	7,38	22,40	9,22
25	"	0,78	1,59	1,84	7,26	22,20	9,65
50	"	0,82	1,64	1,89	7,28	22,20	9,78

de ácidos grasos es semejante a la que acontece en el caso ya considerado de los lípidos totales, en el sentido de que la respuesta al xenobiótico viene en gran medida condicionada por la naturaleza de la fuente de carbono disponible en el medio de cultivo. Efectivamente, en medio con fuente de carbono fermentable (glucosa 1%) la biosíntesis de los ácidos grasos es más rápida en las primeras horas de cultivo, promoviendo un acelerado desarrollo de los mismos; la ligera depresión de los niveles de los ácidos grasos, que se incrementa al aumentar la concentración del PCBs respecto al control, se hace notar a lo largo de todo el período de incubación. Por el contrario, en medios con fuentes de carbono no fermentable (etanol 2%) si bien no se observa un aumento tan rápido -a las 44 horas de cultivo, en medio glucosado, el porcentaje de ácidos grasos respecto al peso seco, es de un 3,5%, mientras que en medio etanolado es de un 2%- , acaban por proporcionar un mayor contenido de ácidos grasos, llegando a ser un 4,5% del peso seco de la levadura. La incorporación del xenobiótico a este medio de incubación parece provocar un ligero efecto estimulador, que se refleja en un aumento de los niveles de ácidos grasos, el cual se ve incrementado con la concentración del PCB.

Los valores obtenidos de la cuantificación de los -

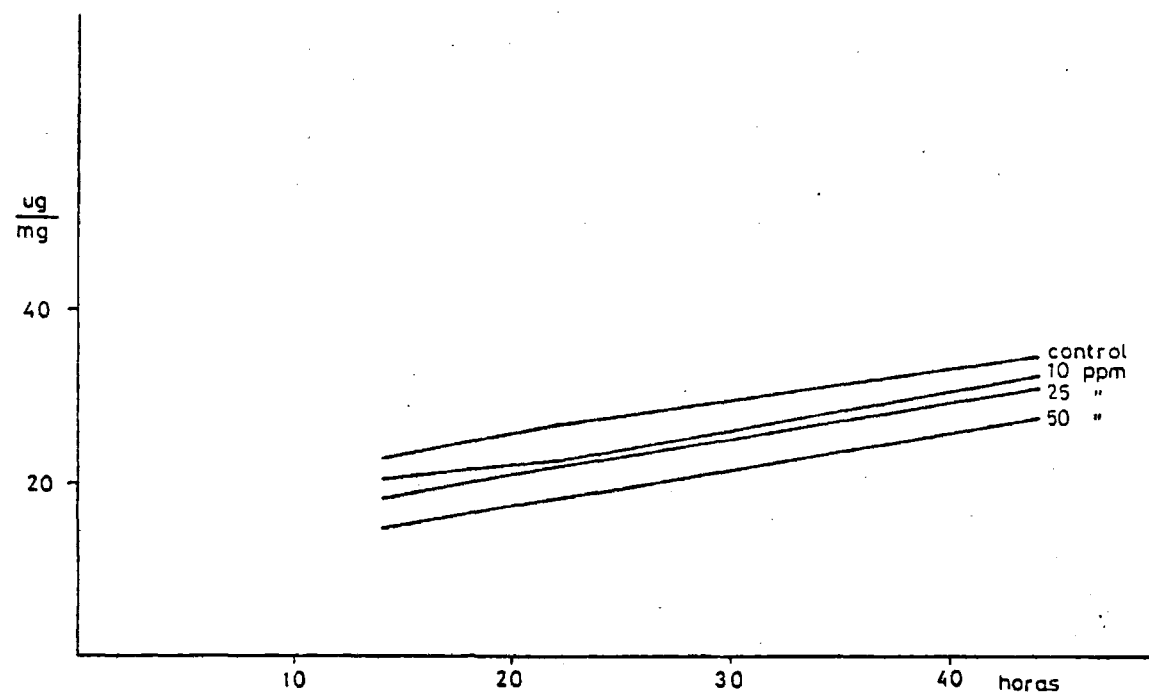


Fig. 34. Evolución de los niveles totales de los ácidos grasos considerados, en función del tiempo, adicionados con concentraciones crecientes de Aroclor 1254. La evolución se estima en μg de ácidos grasos por mg de biomasa.

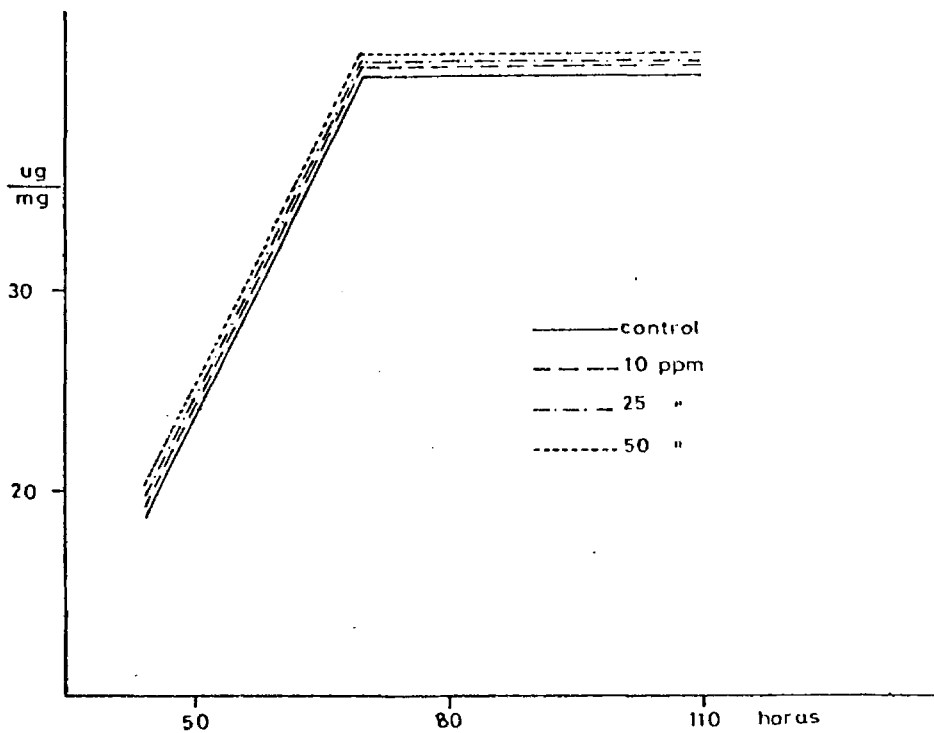


Fig. 35. Evolución de los niveles totales de los ácidos grasos considerados, en función del tiempo, en cultivos etanolados, adicionados con concentraciones creciente de Aroclor 1254. La evaluación se estima en μg de ácidos grasos por mg de biomasa.

ácidos grasos procedentes de cultivos adicionados con Arocloros de diferentes grados de cloración, a una concentración de 50 ppm, se recogen en las Tablas X (medio fermentación).

table) y XI (medio no fermentable) y se representan en las gráficas 36 y 37 respectivamente. Considerando en primer lugar la suma de los ácidos grasos que están siendo objeto de escrutinio, se observa que, en medio glucosado (fig. 36), todos los Arocloros ejercen efectos inhibitorios, haciéndolo en tanto mayor grado cuanto menor es su porcentaje de cloración. Sin embargo, en medios con fuentes de carbono no fermentables (fig. 37), únicamente los Arocloros 1232, 1242 y 1248 ejercen efectos depresores a lo largo de todas las etapas de cultivo; por el contrario, los Arocloros 1254 y 1260 causan un ligero efecto estimulante. En ambos casos se comprueba que tanto los efectos inhibitorios como los estimulantes son más intensos en las primeras horas de la vida de los cultivos, aminorándose las diferencias a medida que dichos cultivos evolucionan hacia la fase final de su desarrollo.

La biosíntesis de los ácidos grasos no saturados de las levaduras, se realiza a partir de sus correspondientes análogos de cadena saturada, Schoenheimer (1930). Este proceso difiere, según Green (1968), del encontrado en algunas bacterias en el que el doble enlace se forma durante el proceso de alargamiento de las cadenas. Con el fin de diferenciar la posible incidencia de los PCBs en el meca

T A B L A X

Niveles de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) encontrados en las células de *S. cerevisiae* adicionadas con 50 ppm de los diferentes Arocloros en medio glucosado al 1%.

Aroclor	Tiempo de cultivo (horas)	Acidos grasos $\mu\text{g}/\text{mg}$					
		C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C _{18:1}
Control	15	0,20	0,30	0,77	3,50	13,04	7,79
1232	"	0,15	0,24	0,71	3,03	7,31	4,40
1242	"	0,16	0,23	0,72	3,21	10,00	5,82
1248	"	0,16	0,25	0,70	3,31	11,62	6,61
1254	"	0,18	0,25	0,72	3,31	11,30	6,63
1260	"	0,19	0,25	0,76	3,40	12,39	7,11
Control	22	0,27	0,35	0,86	3,89	14,60	8,58
1232	"	0,22	0,31	0,76	3,45	10,81	6,19
1242	"	0,25	0,32	0,81	3,62	11,68	6,46
1248	"	0,26	0,32	0,84	3,65	12,60	7,44
1254	"	0,27	0,32	0,83	3,71	12,54	7,05
1260	"	0,26	0,35	0,84	3,75	12,86	6,71

T A B L A X (continuación)

Niveles de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) encontrados en las células de *S. cerevisiae* adicionadas con 50 ppm de los diferentes Arocloros en medio glucosado al 1%.

Aroclor	Tiempo de cultivo (horas)	Acidos grasos $\mu\text{g}/\text{mg}$					
		C_{10}	C_{12}	C_{14}	C_{16}	$\text{C}_{16:1}$	$\text{C}_{18:1}$
Control	28	0,31	0,44	0,96	4,46	15,78	8,90
1232	"	0,29	0,40	0,89	4,03	12,37	7,57
1242	"	0,31	0,42	0,91	4,20	13,86	7,54
1248	"	0,30	0,43	0,91	4,32	15,29	9,09
1254	"	0,31	0,44	0,94	4,45	15,71	8,74
1260	"	0,32	0,44	0,95	4,43	15,97	8,35
Control	44	0,33	0,46	0,99	4,58	16,46	9,58
1232	"	0,30	0,43	0,91	4,23	14,12	9,18
1242	"	0,31	0,43	0,93	4,25	15,51	8,75
1248	"	0,31	0,44	0,93	4,28	15,31	9,84
1254	"	0,32	0,45	0,97	4,33	15,74	9,66
1260	"	0,31	0,46	0,94	4,32	15,75	9,96

T A B L A X I

Niveles de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) encontrados en las células de *S. cerevisiae* adicionados con 50 ppm de los diferentes Arocloros en medio etanolado al 2%.

Aroclor	Tiempo de cultivo (horas)	Acidos grasos $\mu\text{g}/\text{mg}$					
		<u>C₁₀</u>	<u>C₁₂</u>	<u>C₁₄</u>	<u>C₁₆</u>	<u>C_{16:1}</u>	<u>C_{18:1}</u>
Control	46	0,20	0,34	0,83	3,79	14,26	8,48
1232	"	0,19	0,31	0,80	3,75	12,01	7,19
1242	"	0,20	0,32	0,81	3,77	12,90	7,60
1248	"	0,20	0,33	0,81	3,79	13,58	8,12
1254	"	0,21	0,33	0,81	3,92	14,03	8,42
1260	"	0,22	0,35	0,84	4,04	14,30	8,35
Control	70	0,25	0,36	0,95	4,61	16,30	9,24
1232	"	0,24	0,33	0,93	4,48	15,20	8,05
1242	"	0,23	0,34	0,92	4,53	15,71	8,75
1248	"	0,25	0,35	0,94	4,54	16,19	9,13
1254	"	0,24	0,36	0,95	4,70	16,45	9,36
1260	"	0,26	0,36	0,97	4,60	16,38	9,34

T A B L A X I (continuación)

Niveles de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) encontrados en las células de *S. cerevisiae*, adicionadas con 50 ppm de los diferentes Arocloros en medio etanolado al 2%.

Aroclor	Tiempo de cultivo (horas)	Acidos grasos $\mu\text{g}/\text{mg}$					
		<u>C₁₀</u>	<u>C₁₂</u>	<u>C₁₄</u>	<u>C₁₆</u>	<u>C_{16:1}</u>	<u>C_{18:1}</u>
Control	94	0,35	0,48	1,02	5,20	17,73	10,03
1232	"	0,31	0,43	0,99	5,02	16,90	8,52
1242	"	0,33	0,42	0,97	5,13	17,30	9,51
1248	"	0,34	0,47	0,92	5,21	17,50	9,93
1254	"	0,38	0,49	1,10	5,23	17,80	10,09
1260	"	0,39	0,46	1,05	5,21	17,98	10,23
Control	142	0,40	0,48	1,09	5,31	19,00	10,20
1232	"	0,38	0,41	1,05	5,36	18,03	9,57
1242	"	0,39	0,45	1,10	5,30	18,80	9,70
1248	"	0,40	0,48	1,07	5,33	18,93	10,12
1254	"	0,43	0,50	1,16	5,26	19,12	10,20
1260	"	0,44	0,47	1,21	5,28	19,20	10,21

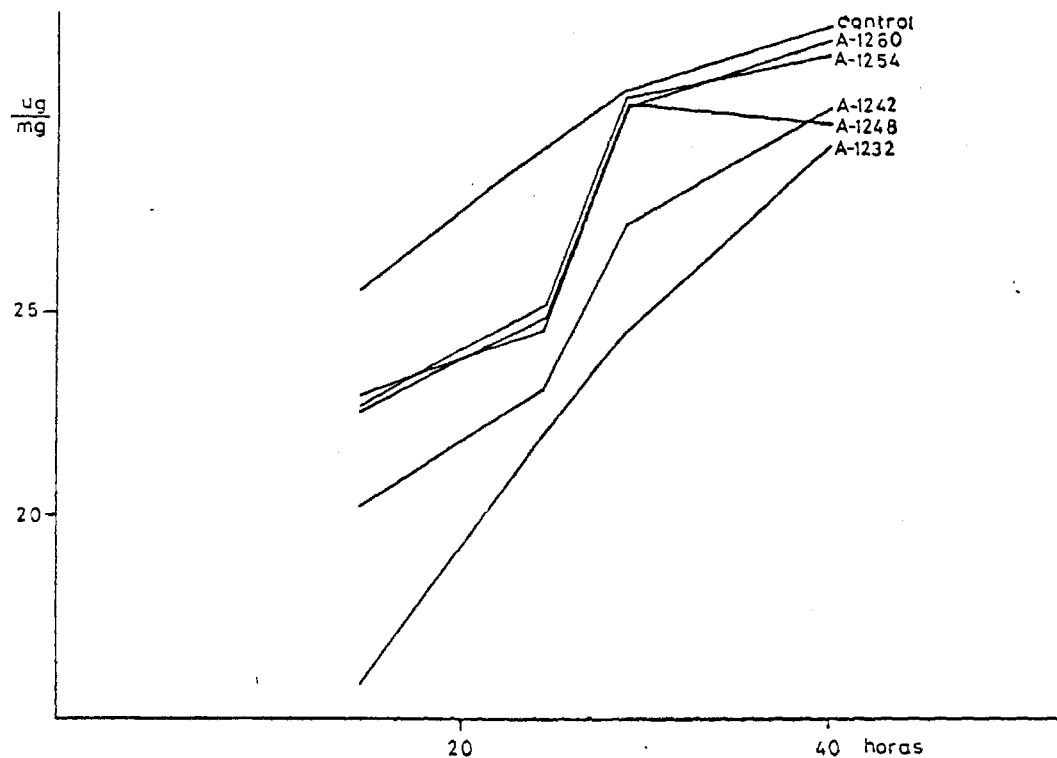


Fig. 36. Evolución de los niveles totales de los ácidos grasos considerados, en función del tiempo, en cultivos glucosados adicionados con 50 ppm de diferentes Aroclores. La evolución se estima en μg de ácidos grasos por mg de biomasa.

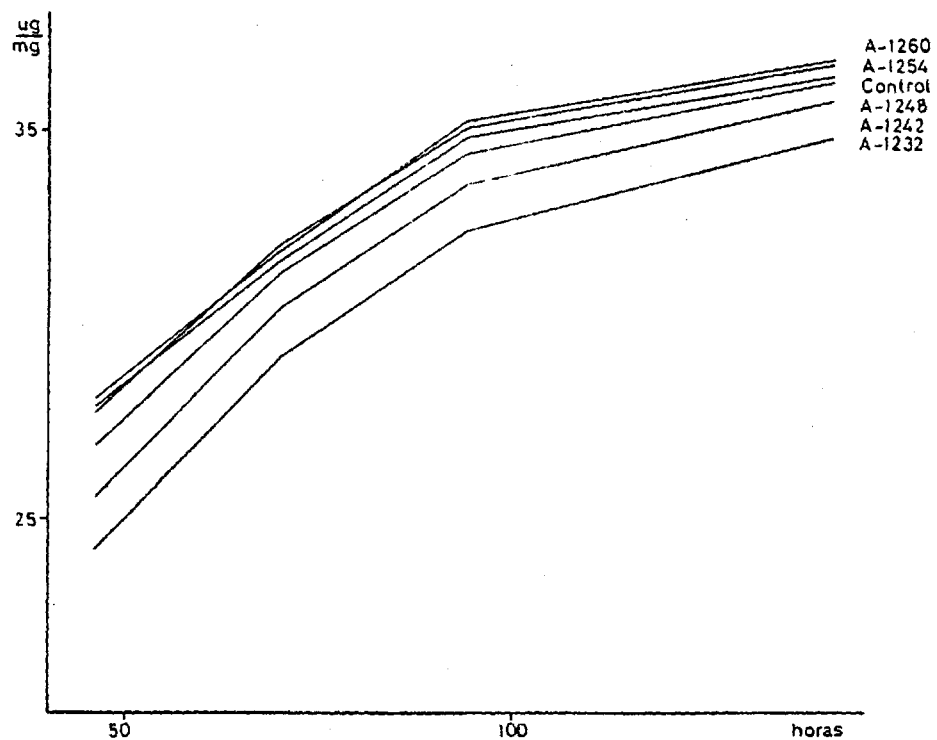


Fig. 37. Evolución de los niveles totales de los ácidos grasos considerados, en función del tiempo, en cultivos etanolados adicionados con 50 ppm de diferentes Aroclor. La evolución se estima en μg de ácidos grasos por mg de biomasa.

nismo biosintético de los ácidos grasos, se dividieron éstos en dos grupos; uno de ellos que reúne los ácidos de cadena saturada (C_{10} , C_{12} , C_{14} y C_{16}) y el otro los que tienen una insaturación en su cadena ($C_{16:1}$ y $C_{18:1}$). En las figuras 38 y 39 se representan las diferencias encontradas en medios fermentables y no fermentables de ambos grupos, y con objeto de observar la evolución de ácido graso mayoritario ($C_{16:1}$), el cual supone el 50% del total, se ha representado en la figura 40 la influencia que sobre la biosíntesis del mismo ejercen los PCBs.

De la observación de dichas figuras se desprende que los PCBs deprimen muy levemente la biosíntesis de los ácidos grasos saturados, apreciándose una inhibición media del 10% respecto al control (excepción hecha de los Arocloros 1254 y 1260 en medios etanolados), mientras que en los insaturados es donde se aprecia una notable influencia de los xenobióticos, alcanzando un porcentaje de inhibición máxima de 56% durante las primeras horas de cultivo. Los trabajos realizados por Bloomfield y Bloch (1958, 1960) y los posteriores de Hunter y Rose (1971), muestran la necesidad de oxígeno molecular en la síntesis de ácidos grasos insaturados, dado que la formación del doble enlace es un proceso oxidativo y no una deshidrogenación y aunque

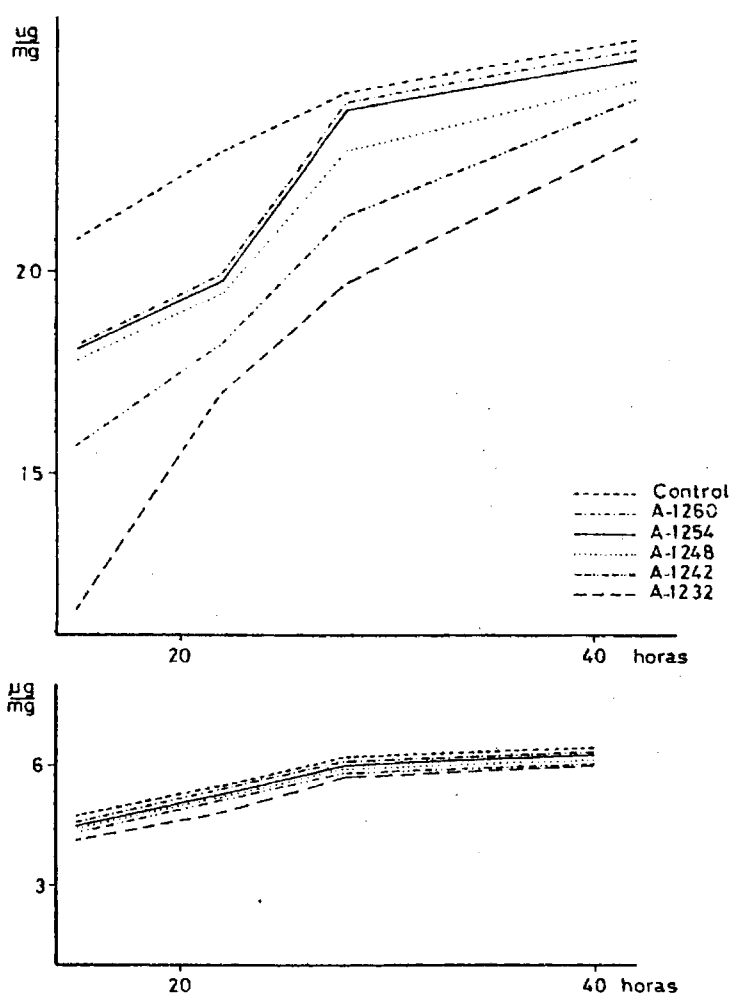


Fig. 38. Evolución de los niveles de los ácidos grasos insaturados (parte superior) y de los ácidos - grasos saturados (parte inferior), en función del tiempo, en cultivos glucosados, adicionados con 50 ppm de diferentes Arocloros. La evolución se estima en μg de ácidos grasos por mg de - biomasa.

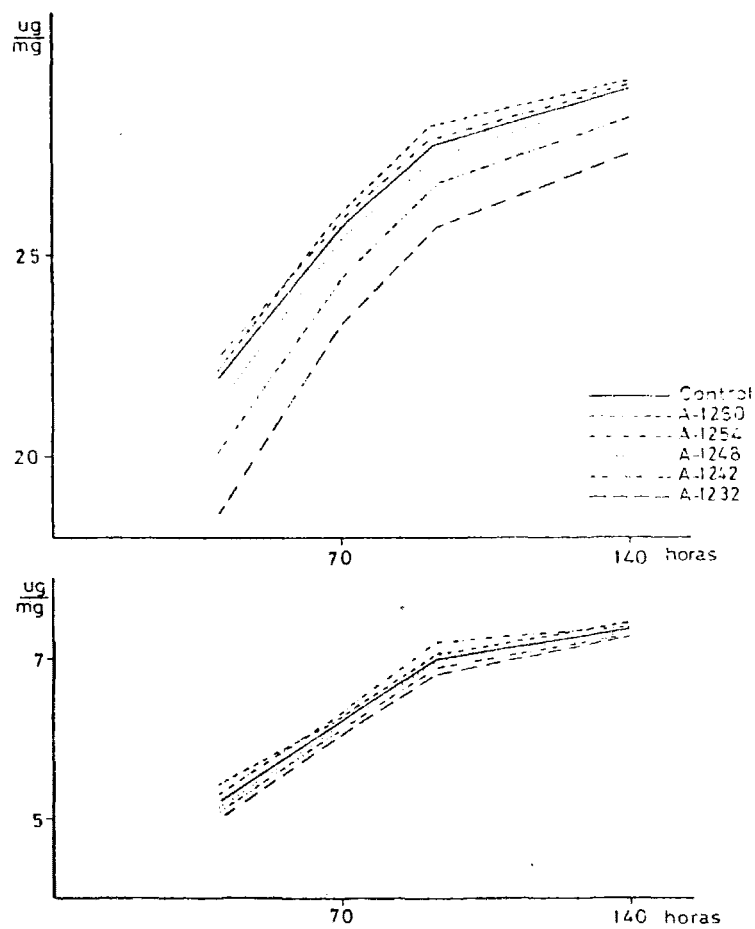


Fig. 39. Evolución de los niveles de los ácidos grasos saturados (parte superior) y de los insaturados (parte inferior), en función del tiempo, en cultivos etanolados, adicionados con 50 ppm de diferentes Arocloros. La evolución se estima en μg de ácidos grasos por mg de biomasa.

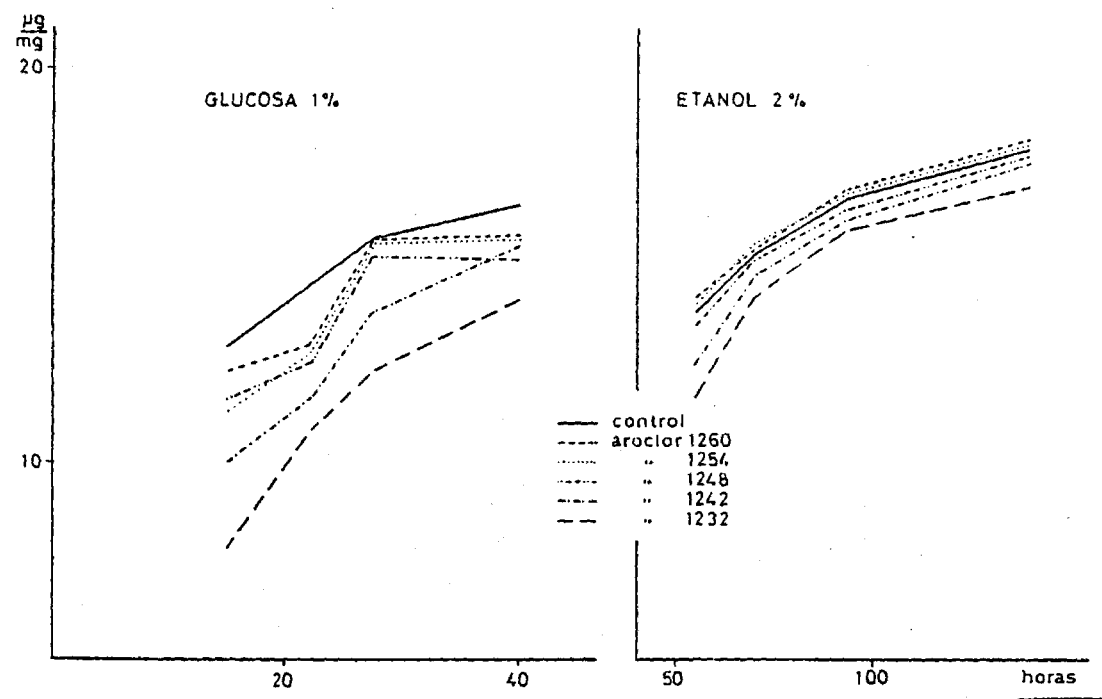


Fig. 40. Evolución de los niveles del ácido palmitoléico en función del tiempo, en cultivos glucosados (izquierda) y etanolados (derecha) adicionados con 50 ppm de diferentes Aroclor. La evolución se estima en μg de ácidos grasos por mg de biomasa.

la carencia de oxígeno molecular afecta a todo el proceso biosintético de los ácidos grasos, es en la formación de los insaturados donde es estrictamente necesario. En efecto, como se puede apreciar en las figuras 38 y 39, son los Arocloros 1232 y 1242 los que ocasionan un decaimiento mayor de los niveles de los ácidos palmitoléico y oléico; la incidencia del Aroclor 1248 es mucho menos significativa, mientras que la de los Arocloros 1254 y 1260 es nula.

De lo expuesto podría deducirse que los PCBs deben intervenir en los procesos donde la utilización de oxígeno molecular es imprescindible e insustituible por otros aceptores de electrones, lo cual está de acuerdo con los trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio por Tejedor (1977), en el sentido de que los PCBs menos clorados son los que en mayor medida bloquean la actividad transportadora de electrones -al menos parcialmente- a nivel de algún eslabón de los comprendidos entre el citocromo b y el oxígeno molecular.

7.2. INCIDENCIA DE LOS PCBs SOBRE LOS ESTEROLES INTEGRANTES
DE LA SUBFRACCION INSAPONIFICABLE

El resto de la fracción insaponificable de la fracción lipídica constituida fundamentalmente por compuestos con estructura de ciclopentano perhidrofenantreno, planteó ciertas dificultades de tipo analítico que, resueltas de la forma descrita en el capítulo de Materiales y Métodos, permitió la correcta identificación mediante cromatografía gas-líquido, de las señales correspondientes al escualeno (precursor de los esteroides), lanosterol y ergosterol. La asignación de las restantes señales, debido a la carencia de patrones adecuados, fué hecha en base a los tiempos de retención, comparando los perfiles cromatográficos existentes en la bibliografía (Yamaguchi, 1970; Longley, 1968), con los obtenidos por nosotros, de esta forma fueron identificados el zimosterol y episterol.

En la figura 41 se recogen los niveles detectados de escualeno y ergosterol en cultivos glucosados al 1% y dosificados con 50 ppm de los Arocloros 1232, 1242, 1254 y 1260. Las determinaciones fueron efectuadas en la fase exponencial de crecimiento (23 horas) y en el final de la fase estacionaria (47 horas). La observación de la citada gráfica per-

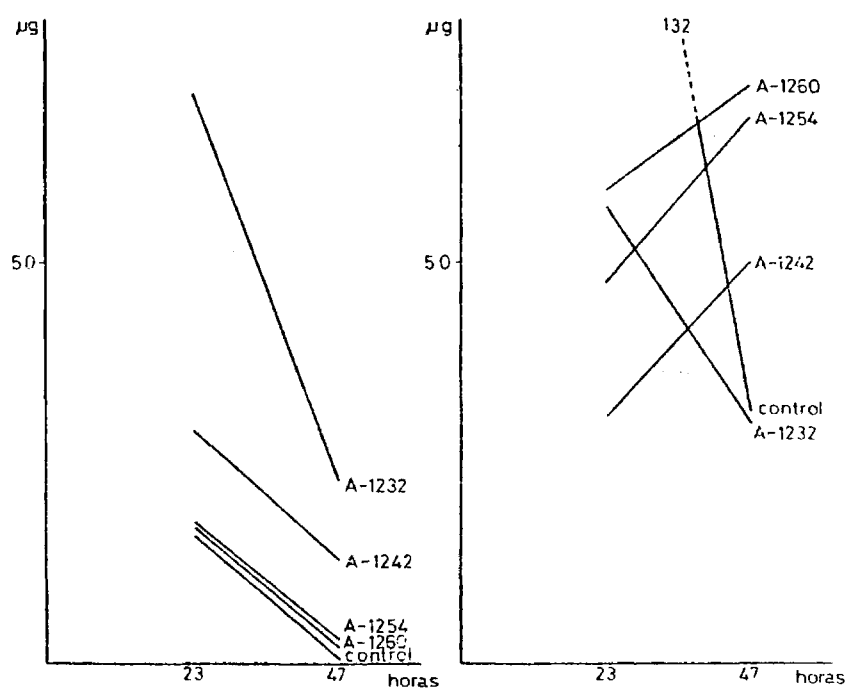


Fig. 41. Evolución de los niveles de escualeno (izquierda) y ergosterol (derecha), en función del tiempo, en cultivos glucosados adicionados con 50 ppm de diferentes Arocloros.

mite afirmar que en el caso del escualeno todos los cultivos dosificados con los diferentes Arocloros presentan niveles superiores -a lo largo de todo el período de tiempo considerado- a los de cultivo control. Esta elevación de las cantidades es tanto mayor cuanto menor es el porcentaje de cloración del Aroclor utilizado y particularmente intensa en el caso del 1232; así, en la fase logarítmica es - 4,4 veces superior a los controles, incrementándose hacia el final de la fase estacionaria; el resto de los Arocloros utilizados dan lugar a unos niveles de escualeno mucho más reducidos, tal es así en el caso de los Arocloros 1254 y 1260 que prácticamente coinciden con los valores obtenidos en los controles. Lo expuesto permite deducir en primera instancia dos consideraciones: 1º) Los PCBs ensayados estimulan la biosíntesis del escualeno, 2º) los PCBs alteran una o más etapas de la síntesis del ergosterol, posteriores a la biosíntesis del escualeno, de forma que éste queda acumulado. La validez de estas alternativas, ambas teóricamente válidas, serán discutidas con posterioridad en este mismo capítulo.

En lo que hace referencia a las cantidades de ergosterol halladas en los mismos cultivos y a los mismos tiempos de incubación, se observan dos comportamientos totalmente di-

ferentes en dependencia del Aroclor adicionado al cultivo; así en el caso del A-1232 los niveles de ergosterol descienden de forma paulatina con el tiempo, de forma análoga a como lo hacen los de los cultivo control; éstos son siempre superiores a aquellos, si bien la diferencia se aminora con la edad del cultivo (1,5 veces a las 23 horas y practicamente coincidentes a las 47 horas). Sin embargo, los cultivos dosificados con los Arocloros 1242, 1254 y 1260, que a las 23 horas exhiben cantidades inferiores a las de los controles, aumentan de manera progresiva sus niveles de forma que a las 31, 34 y 40 horas, respectivamente, dichos Arocloros igualan los de los controles, superándolos ampliamente a partir de este momento. De estos resultados se deducen - dos consideraciones: 1) La adición al cultivo del Aroclor 1232 inhibe la biosíntesis de ergosterol; 2) La dosificación de cultivos con los Arocloros 1242, 1254 y 1260 se - traduce en una formación de ergosterol superior a la de los controles. En la figura 42 se representa -en función de la edad del cultivo- el cociente entre la cantidad de ergosterol y la de escualeno, hallada en cada momento en diferentes cultivos glucosados tratados con los xenobióticos y en controles "ad hoc". De la observación de la misma surge una primera consideración, consistente en constatar la

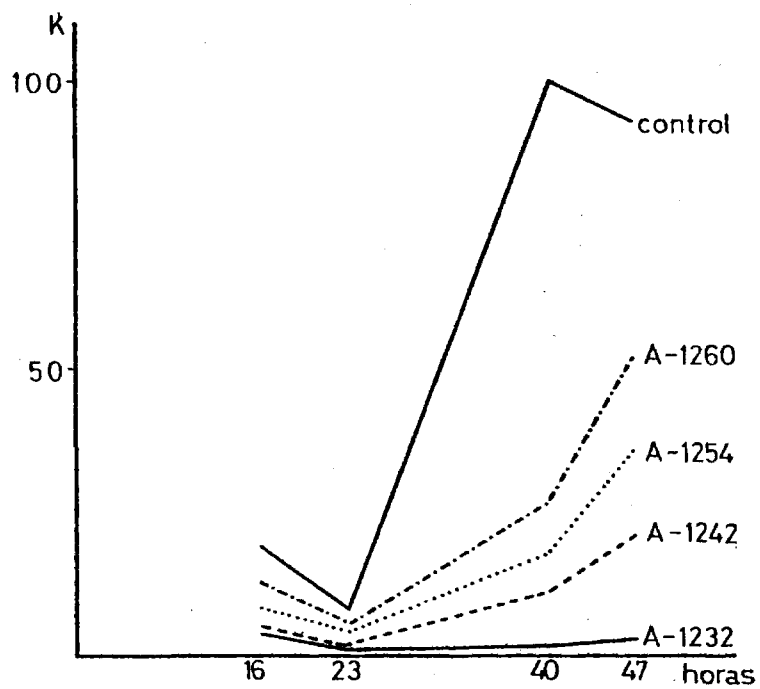


Fig. 42. Evolución de la relación entre los niveles de ergosterol y escualeno, en función del tiempo, en cultivos glucosados adicionados con 50 ppm de diferentes Aroclorés. $K = \mu\text{g ergosterol} / \mu\text{g escualeno}$.

existencia de dinámicas semejantes tanto al considerar la evolución de la biomasa como la de la relación ergosterol/escualeno en cultivos control. Sin embargo, los cultivos dosificados con los PCBs, aún continúan incrementando sus

niveles de ergosterol cuando los del control ya están en descenso. (Ver asimismo figura 41).

De ello, se colige que aún cuando los cultivos dosificados con los Arocloros más clorados alcanzan niveles de ergosterol superiores a los controles, lo hacen con un cierto retardo, lo que presupone la necesidad de un período de adaptación al xenobiótico por parte de la levadura.

Del escrutinio de la gráfica merece destacarse el hecho de que a las 23 horas todos los cultivos presentan un mínimo en la relación Ergosterol/Escualeno. Ello es debido no al descenso de las cantidades de ergosterol, si no al incremento habido en las de escualeno; el valor de la relación en el caso del control es función de los menores valores de escualeno detectados.

El estudio de los resultados obtenidos en los cultivos etanolados, recogidos en la figura 43, revela la existencia de ciertas analogías y diferencias con respecto a las observadas en los cultivos glucosados. Así, en lo que hace referencia a la biosíntesis de escualeno, el examen de dicha figura permite comprobar que la adición del Aroclor 1232 se traduce en un gran aumento en la producción de dicho hidrocarburo con respecto a la de los controles.

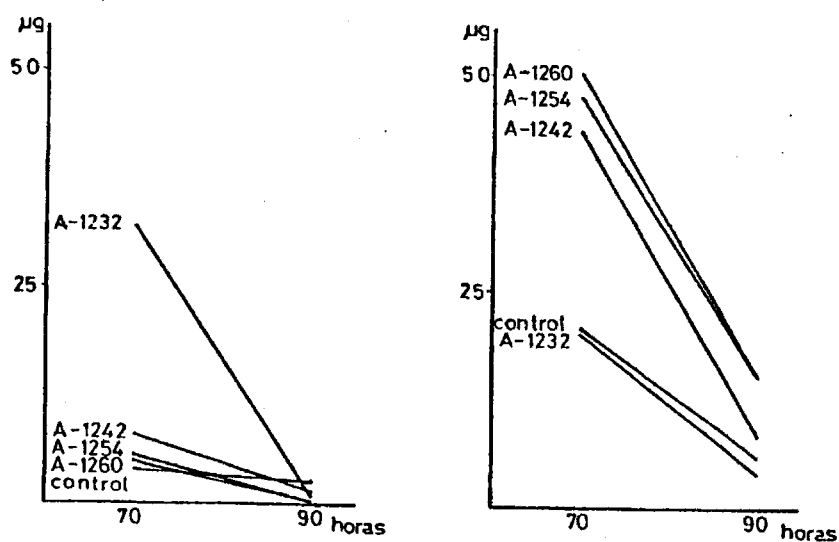


Fig. 43. Evolución de los niveles de escualeno (izquierda) y ergosterol (derecha), en función del tiempo, en cultivos etanolados adicionados con 50 ppm de diferentes Arocloros.

en una toma efectuada cuando el cultivo se encuentra en la fase exponencial del crecimiento. Sin embargo, el resto de los Arocloros no ocasionan diferencias sustanciales en los niveles de escualeno, si bien es cierto que todos los cultivos dosificados con los xenobióticos presentan valores su-

periores al control tanto más elevados cuanto menor es el porcentaje de cloración del PCB. Las concentraciones de escualeno determinadas al final de la fase estacionaria, son enteramente análogas entre sí, sin que la incidencia del - grado de cloración -aún existente- sea en exceso significativa.

En lo que concierne a las cantidades detectadas de - ergosterol efectuadas a las mismas edades de cultivo que en el caso anterior, cabe decir que tanto a las 70 como a las 90 horas, sus niveles exceden a los de los controles en todos aquellos cultivos dosificados con los Arocloros 1242, 1254 y 1260, ordenándose precisamente según el porcentaje de cloración de éstos.

Sin embargo, -y al igual que sucedía en los glucosa dos- los cultivos a los cuales se ha adicionado 50 ppm de Aroclor 1232 presentan unos niveles de ergosterol ligeramente deprimidos respecto a los de los controles.

A la luz de lo expuesto hasta el momento pueden deducirse una serie de consideraciones acerca de las implicaciones de los diferentes PCBs ensayados sobre la formación de ergosterol por parte de la levadura, consideraciones éstas que para su mejor entendimiento conviene dividir en dos partes:

1) Incidencia del Aroclor 1232.- Este PCB, tanto en los cultivos adicionados con glucosa como a los que se ha añadido etanol, da lugar a una elevación de los niveles de escualeno y a una depresión de los de ergosterol, en cualquier momento de la vida de los cultivos y siempre en comparación con la de los controles,. Asumiendo la secuencia biosintética propuesta por Kato (1976) recogida en la figura 44, parece lógico afirmar que la acumulación del escualeno y la disminución del ergosterol sólo puede ser debida a la inhibición de alguna de las etapas en la cadena biosintética esquematizada en la ruta metabólica.

En la figura 45 se comparan, en forma de histogramas, los niveles de todos los esteroides (y de sus precursores) - cuantificados cromatográficamente y procedentes de cultivos controles y de cultivos dosificados con Aroclor 1232, en ambos casos glucosados; en la figura 46 se efectúa la misma comparación con la única diferencia de que el medio de cultivo utilizado no es el fermentable. Como se puede observar, en ambos casos, tan solo los niveles de escualeno son superiores en los cultivos tratados con el xenobiótico, mientras que los de lanosterol, zimosterol, episterol y ergosterol son mayores en los controles. De ellos se deduce que, -siguiendo la ruta metabólica propuesta- la alteración

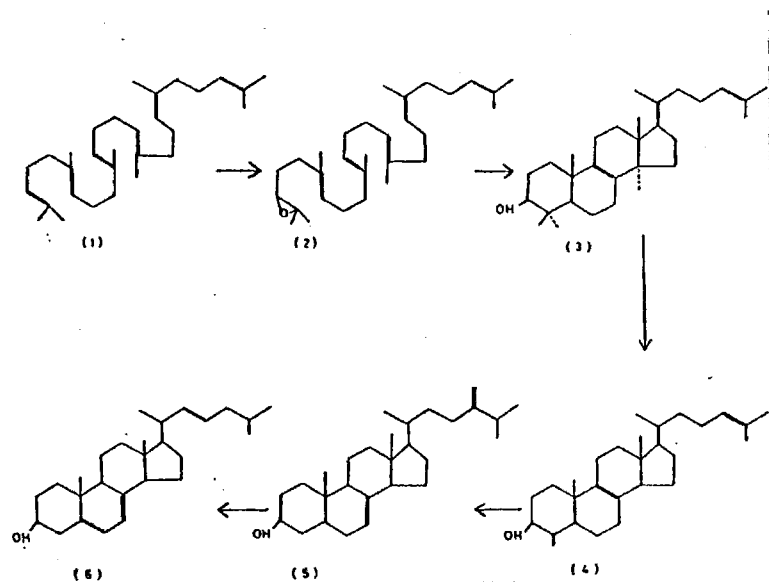


Fig. 44. Secuencia biosintética del ergosterol, Kato (1976). (1) escualeno, (2) óxido de escualeno, (3) lanosterol, (4) zimosterol, (5) episterol, (6) ergosterol.

debe estar localizada bien en la transformación del escualeno en 2-3 óxido escualeno o bien en la de este compuesto en lanosterol. La primera reacción está catalizada por una hipotética escualeno-epoxidasa, mientras que la segunda lo está por una ciclasa (White, 1969). Asumiendo la idea -

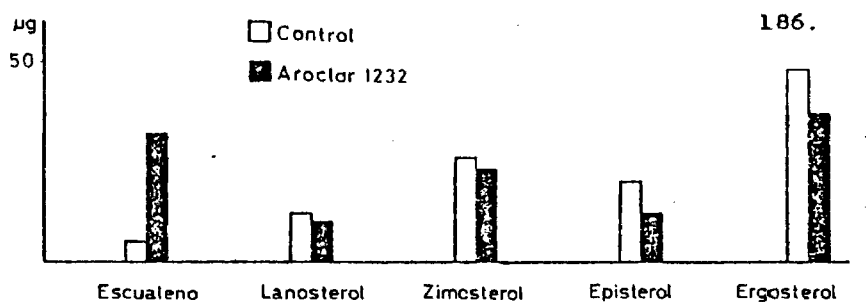


Fig. 45. Comparación de los niveles de ergosterol y precursores procedentes de cultivos control y adicionados - con 50 ppm de Aroclor 1232, en ambos casos en medio glucosado.

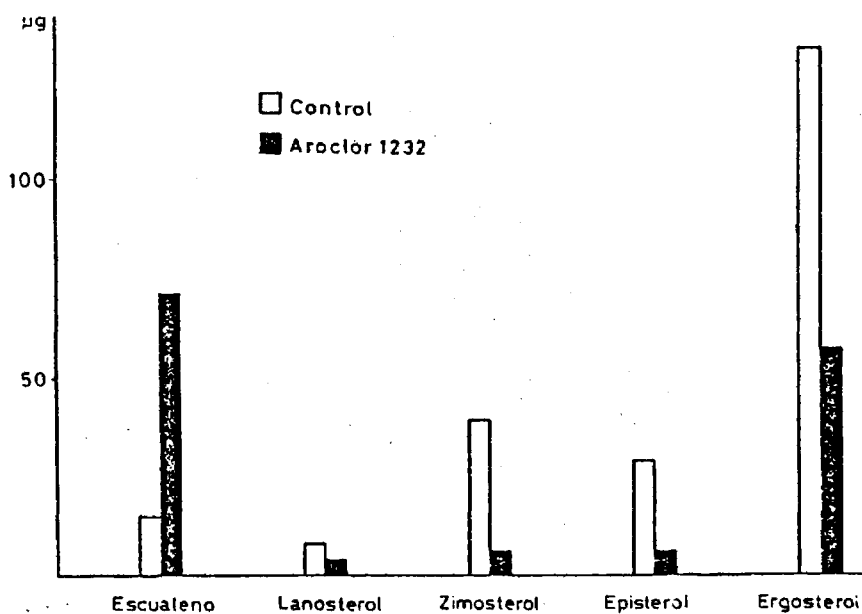


Fig. 46. Comparación de los niveles de ergosterol y precursores procedentes de cultivos control y adicionados - con 50 ppm de Aroclor 1232, en ambos casos en medio etanolado.

apuntada por Tejedor (1977) acerca de que los efectos de - los PCBs podrían traducirse en un bloqueo parcial de la cadena de transporte electrónico a nivel de los citocromos, - puede pensarse en principio que la enzima que resulta parcialmente inhibida es la epoxidasa, con lo cual podría explicarse la acumulación de escualeno. Este razonamiento se ve apoyado por los experimentos de Hunter (1971) acerca de que la transformación especificada requiere la presencia de oxígeno molecular, NADP H₂ y hierro.

2) Inidencia de los Arocloros 1242, 1254 y 1260.

La adición de estos compuestos xenobióticos a cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* llevados a cabo en medios fermentable y no fermentable proporciona unos niveles de escualeno que se estiman superiores a los de los cultivos control. - Este aumento de las cantidades de escualeno detectadas -que es tanto más intenso cuanto menor clorado es el Aroclor utilizado- podría explicarse admitiendo la existencia, bien de una inhibición similar a la expuesta anteriormente bien de una estimulación de la biosíntesis de escualeno. Del hecho de que la secuencia A-1242, A-1254 y A-1260, establecida ordenando los niveles de escualeno de mayor a menor, se invierta al considerar las cantidades de ergosterol detectadas, se deduce la concurrencia de ambos mecanismos:

una inhibición enzimática en la transformación escualeno -
→ 2,3 oxido escualeno, que es tanto más intensa cuanto menor es el grado de cloración, y una estimulación generalizada a todo el proceso que se correlaciona directamente con el porcentaje de cloración. Así, se explica que el Aroclor 1242 que proporciona niveles superiores de escualeno a los de los Aroclores 1254 y 1260, da lugar a cantidades menores de ergosterol que los dos últimos Aroclores mencionados. Fenómeno que se repite al considerar tan solo niveles de am bos compuestos obtenidos en los cultivos tratados con los - Aroclores 1254 y 1260.

8. INCIDENCIA DE LOS PCBs SOBRE LA ACTIVIDAD CATALASICA
DE *Saccharomyces cerevisiae*.

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad de la catalasa en células de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en condiciones aerobias en un medio glucosado al 1%, muestran que el valor mínimo de dicha actividad se obtiene al comienzo de la fase exponencial, alcanzando el máximo entre las 40-50 horas de cultivo, lo que coincide con la fase estacionaria del mismo. Durante la fase de muerte (Rose, 1969) los niveles catalásicos decrecen paulatinamente hasta estabilizarse en unos valores relativamente próximos a los habidos durante la fase de latencia. Estos resultados son enteramente análogos a los obtenidos por Pacheka et al (1971), en cultivos semejantes del mismo microorganismo.

En las figuras 47 y 48 se muestran los valores de la actividad catalásica en presencia de los Arocloros 1232 y 1254.

En ambos casos la actividad enzimática en las células de los cultivos control es superior a las de los cultivos suplementados con diferentes concentraciones de xenobióticos.

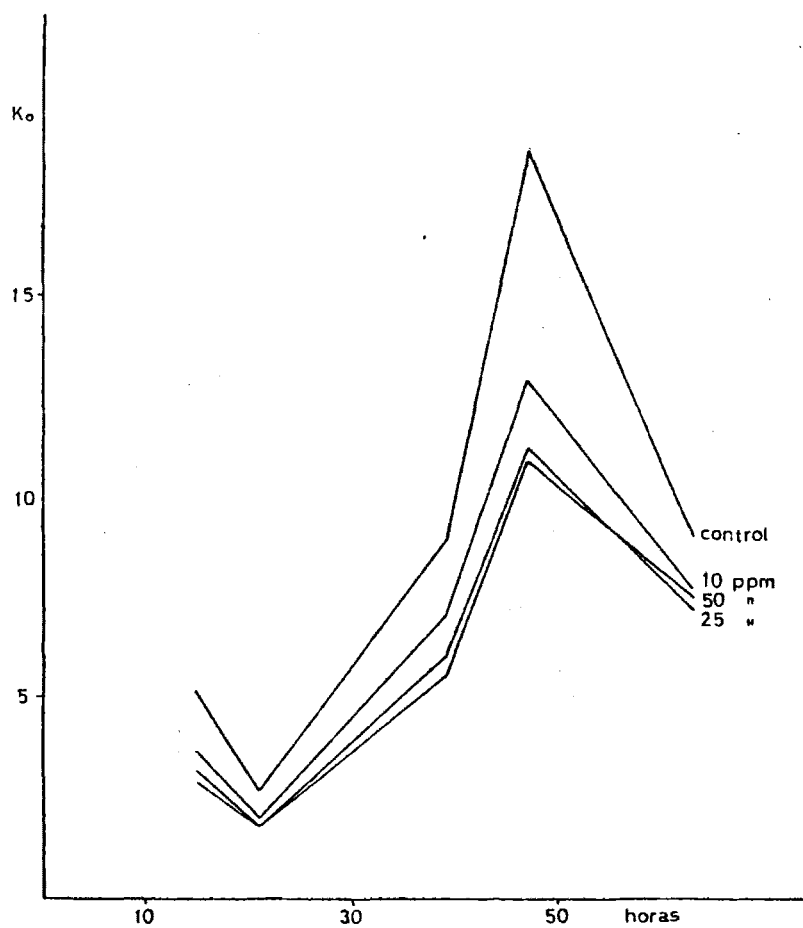


Fig. 47. Incidencia, en función del tiempo, de diferentes concentraciones de Aroclor 1232 sobre la actividad catalásica de *S. cerevisiae* en cultivos glucosados al 1%.

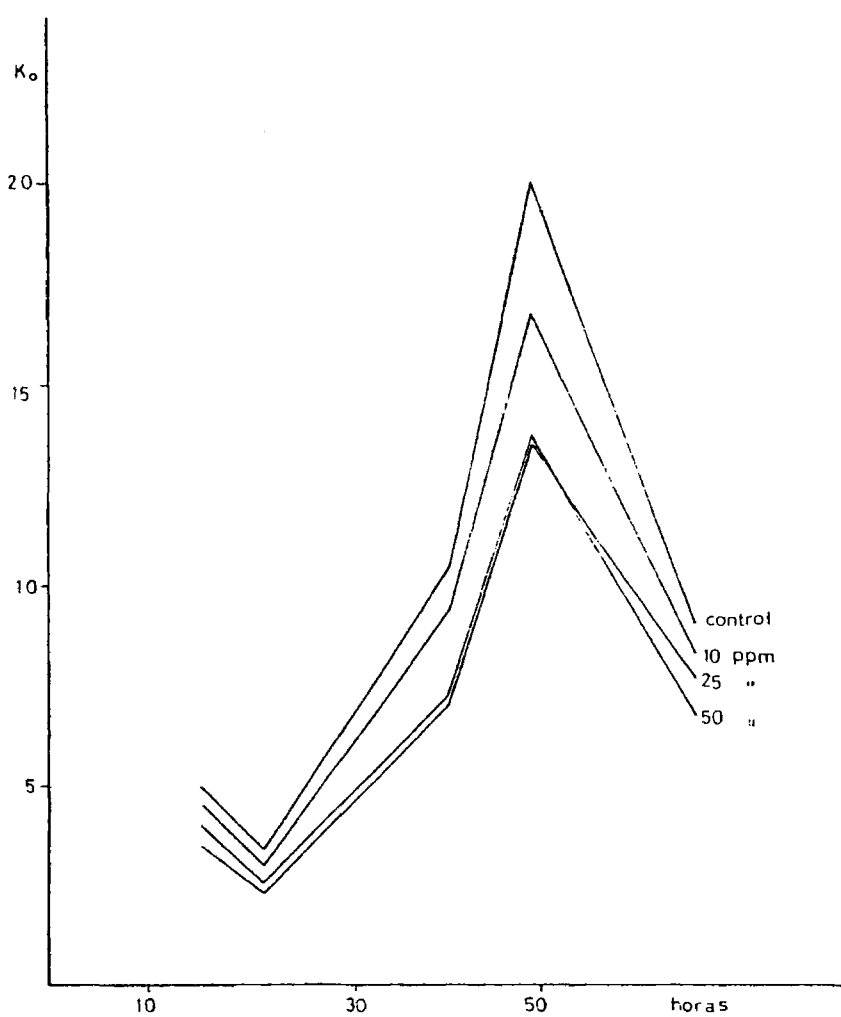


Fig. 48. Incidencia, en función del tiempo, de diferentes concentraciones, de Aroclor 1254, sobre la actividad catalásica de *S. cerevisiae* en cultivos - glucosados al 1%.

co, acentuándose la diferencia en el caso del A-1232, cuando los cultivos se encuentran en la fase estacionaria.

Los efectos de los PCBs sobre la actividad catalásica aumentan con la cantidad del xenobiótico adicionado, incrementándose progresivamente desde 10 a 50 ppm, aunque no de forma proporcional, ya que, con 25 ppm el grado de depresión tiende a estabilizarse, siendo escasamente significativa la disminución ocasionada en dicha inhibición cuando se añaden 50 ppm.

Dado que solo fueron investigados los dos Arocloros antes mencionados no es posible establecer una correlación entre la inhibición constatada y el porcentaje de cloración, solo puede afirmarse que el Aroclor 1232, de grado de cloración inferior al Aroclor 1254, ocasiona mayores efectos depresores que este.

Es interesante mencionar aquí, que por los trabajos realizados por Tejedor (1977) se demostró -en lo que se refiere al consumo de oxígeno- que la magnitud de los efectos de los PCBs es máxima en el Aroclor 1232 y decrece a medida que aumenta el porcentaje medio de cloración, por lo que se asume que los PCBs deben alterar de algún modo la mecánica del metabolismo oxidativo.

Pudiera pensarse que la inhibición de la catalasa, así como la reducción del consumo de oxígeno fuese debido a la extinción de las células durante el período de incubación con los xenobióticos, pero esta posibilidad ya quedó descartada al incubar las células en medios dosificados con PCBs, obteniéndose cultivos cuyo peso seco es igual a los cultivos no contaminados.

De lo expuesto cabe deducir que la disminución de la actividad catalásica puede ser debida a una inhibición de la biosíntesis de la enzima, o de las enzimas respiratorias. En la bibliografía al respecto no se ha encontrado ninguna referencia acerca de la incidencia directa de los PCBs sobre la síntesis de la proteína citoplasmática en levaduras y si existen numerosos antecedentes en torno a que la inhibición catalásica sea consecuencia de las enzimas respiratorias. Jayaraman (1966) asume que en una cadena respiratoria inactiva, la acumulación de catabolitos de la glucosa puede originar una inhibición en la síntesis de catalasa por represión catabólica; Schatz (1969), en experiencias llevadas a cabo con cloranfenicol, indica la posibilidad de la síntesis de un factor mitocondrial que en combinación con el oxígeno constituye un complejo inductor activo de la biosíntesis de catalasa por la levadura. La inhibición de la síntesis de

este factor por el cloranfenicol podría traducirse en tan solo una inducción parcial de la biosíntesis de catalasa. Por último, Pacheka (1970) sugiere una interdependencia entre la biosíntesis de catalasa y la de las enzimas de cadena respiratoria, de forma que el decaimiento de los niveles catalásicos sea debido a la inhibición de las enzimas respiratorias. Por otra parte, existen pruebas acerca de la acción de insecticidasorgano-fosforados (Sitkiewicz, 1975) y organoclorados (Pardini, 1970, 1971 ; Sivalingan, 1973; - Nelson, 1971) e incluso PCBs (Tejedor, 1977) como desacopladores del transporte electrónico. Todo ello nos conduce a pensar que la incidencia de los PCBs sobre la actividad catalásica tiene lugar, probablemente, a nivel de su interrelación con las enzimas respiratorias, y no a consecuencia de una inhibición directa de la síntesis de la catalasa.

9. INDICENCIA DE LOS PCBs SOBRE LA CAPACIDAD FERMENTA-
TIVA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Con el objeto de cuantificar la incidencia de los PCBs sobre el proceso de fermentación alcohólica se adicionaron - los cultivos, cuya fuente carbonada consiste en 1% de glucosa en unos casos y en 3% en otros, con 25 y 50 ppm de los Arocloros 1242, 1248, 1254 y 1260.

Como se ha indicado en la parte experimental de esta Memoria, para la determinación del etanol presente en los - cultivos se siguieron dos procedimientos distintos, uno enzimático y otro refractométrico, proporcionando ambos valores sensiblemente equivalentes. De los resultados, recogidos en la tabla XII, se deduce en primer lugar que la dosificación de los cultivos con los diferentes Arocloros origina una - disminución en la cantidad de etanol producida, respecto a la de los cultivos control, tanto si la cantidad de glucosa presente es de 1% ó del 3%. Esta depresión se correlaciona directamente con la concentración de xenobiótico aunque no de forma lineal; asimismo, se pone de manifiesto que los Arocloros menos clorados son los que producen el mayor efecto depresor, es decir, se establece una relación inversa respecto al grado de cloración. En la figura 49 se comparan

T A B L A XII

Porcentajes de etanol determinados en los medios de cultivo
de S. cerevisiae adicionadas con 25 y 50 ppm de diferentes
Aroclor, en medios glucosados al 1% y 3%.

<u>Aroclor</u>	<u>Concentración</u> <u>(ppm)</u>	<u>Glucosa</u> <u>%</u>	<u>Etanol</u> <u>%</u>
Control	0	1	100
1242	25	"	43,94
1248	25	"	60,01
1254	25	"	67,59
1260	25	"	74,26
1242	50	"	32,54
1248	50	"	55,63
1254	50	"	53,35
1260	50	"	61,75
Control	0	3	100
1242	25	"	56,82
1248	25	"	72,29
1254	25	"	77,35
1260	25	"	84,38
1242	50	"	50,07
1248	50	"	59,77
1254	50	"	75,55
1260	50	"	80,02

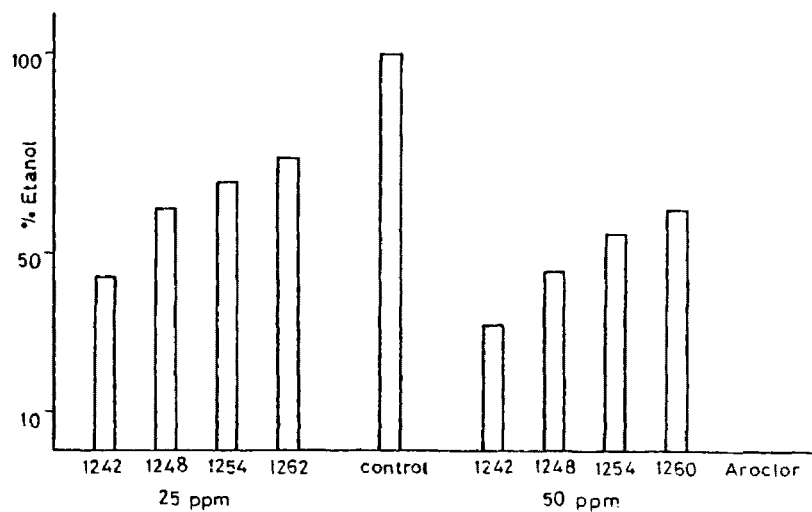
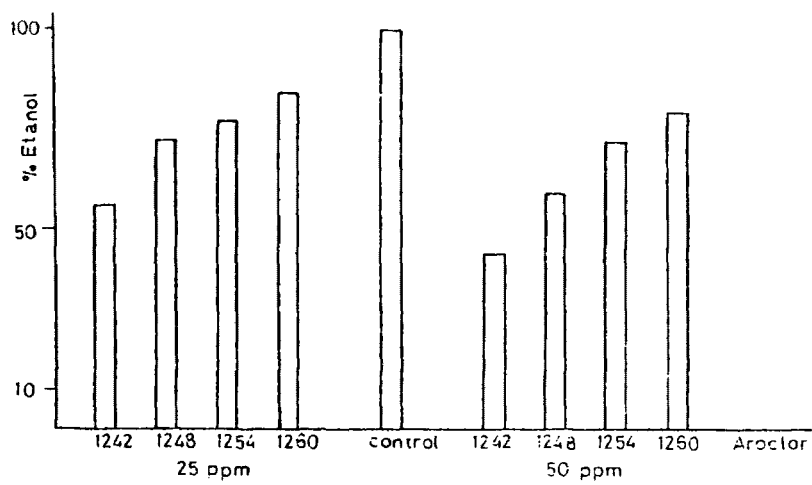


Fig. 49. Incidencia a distintas concentraciones de diferentes Aroclor sobre la fermentación alcohólica de *S. cerevisiae*. En la parte superior, en cultivos glucosados al 3%; en la inferior, en cultivos glucosados al 1%.

los porcentajes de etanol producidos por los cultivos dosificados con los diferentes Arocloros con los de los cultivos control, después de adjudicar a éstos el valor 100.

En la Tabla XIII se comparan los resultados encontrados por nosotros con los hallados por Singh et al (1977), en un estudio de objetivos análogos llevado a cabo con diferentes insecticidas organoclorados.

T A B L A X I I I

Influencia de diferentes compuestos organoclorados en la producción de etanol por células de *S. cerevisiae*.

	<u>ppm</u>	<u>Etanol %</u>		<u>ppm</u>	<u>% Etanol Glucosado</u>
Control	-	100		-	100
Heptacloro	15	45	Aroclor 42	55	50,38
	30	28		50	41,30
D D T	15	72	Aroclor 48	25	66,60
	30	57		50	57,70
Endrin	15	57	Aroclor 54	25	72,47
	30	38		50	64,45
Lindano	15	68	Aroclor 60	25	79,32
	30	45		50	70,88

De su observación se pueden deducir ciertas conclusiones acerca del grado de toxicidad que los diferentes contaminantes clorocarbonados ejercen sobre el *Saccharomyces cerevisiae*, cuantificado mediante la disminución del etanol producido.

Los cultivos a los que se adiciona 25 ppm de Aroclor 1242, 30 ppm de lindano o 15 ppm de heptacloro, dan lugar a un 45-50% del etanol formado por los controles; 30 ppm de DDT, 15 ppm de endrin ó 50 ppm de Aroclor 1248 dan porcentajes - del orden del 57%, mientras que la adición de 15 ppm de DDT, 15 ppm de lindano, 50 ppm de Aroclor 1260 o' 25 ppm de Aroclor 1254 originan reducciones del 28-32% respecto al producido por los controles.

Teniendo en cuenta las diferentes concentraciones de los distintos xenobióticos añadidos a los cultivos, cabe inferir que el efecto tóxico de los Arocloros más clorados - (1254 y 1260) es menor que la de algunos insecticidas organo clorados, de toxicidad intermedia como son el DDT y el lindano. Asimismo, los riesgos tóxicos de los Arocloros menos clorados (1248 y 1242) son inferiores a los implicados por los insecticidas ciclodiénicos, comunmente considerados como más tóxicos, como el endrin y heptacloro.

En la figura 50 se recoge, bajo la forma de histogra

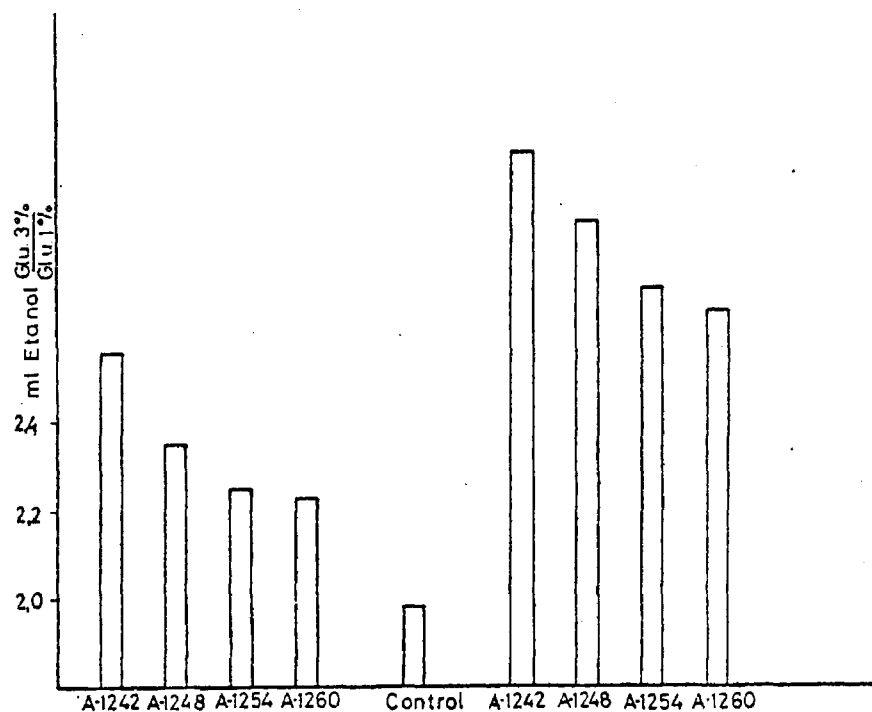


Fig. 50. Relación entre etanol formado en cultivos glucosados al 3% y cultivos - glucosados al 1% en presencia de diferentes Aroclores. Al la izquierda, cultivos adicionados con 25 ppm, y a la derecha, cultivos adicionados con 50 ppm.

mas, la relación existente entre el alcohol producido por cultivos cuya fuente de carbono es 3% de glucosa y aquellos en que la proporción de azúcar queda reducida a 1%, siendo el resto de las condiciones exactamente iguales para ambos tipos de cultivo. De las relaciones cuantitativas resalta el hecho de que el cociente entre el etanol producido por los cultivos con 3% de glucosa y el obtenido de los que tienen el 1% del mismo azúcar, no se aproxima al valor teórico 3 como era de esperar, si no que se sitúa a un nivel de 1,98. En el caso de los cultivos control, la explicación de esta supuesta anomalía vendría dada por el hecho de que, a lo largo de toda la experimentación llevada a cabo, se ha comprobado que los cultivos con 1% de glucosa se encuentran a las 45 horas -tiempo en el que se detiene la incubación- en la fase estacionaria, debido al agotamiento de un nutriente esencial como es la fuente carbonada, que, en este caso, actúa como factor limitante (Brock, 1978). Sin embargo, en los cultivos con 3% de glucosa, no todo el azúcar ha sido consumido y no se ha alcanzado todavía la fase estacionaria y por tanto la transformación glucosa \longrightarrow etanol no ha sido llevada a cabo en su totalidad.

Accediendo a los cultivos glucosados con un 1% y dosificados con 25 ppm de los diferentes Arocloros, cabe con

siderar que se encuentran sometidos a dos factores limitantes: concentración de glucosa y presencia del xenobiótico, mientras que los que han sido tratados con 50 ppm, aun se encuentran limitados por un tercer factor como es la superior concentración del componente tóxico. En el caso de estos - mismos cultivos con un 3% de glucosa, los microorganismos - se encuentran sometidos a uno o dos factores limitantes -según consideremos cultivos con 25 ó 50 ppm de PCBs-, ya que ha desaparecido el tercer factor -la concentración de glucosa- como ya se ha comentado.

La liberación de esta dependencia respecto a uno de los factores podría explicar que, en el caso de 25 ppm, el incremento en la cantidad de etanol producido no sea el teórico de 3, ni el de 1,98 de los controles, sino 2,3 veces; razonamiento igualmente válido para los cultivos con 50 ppm, que producen 2,6 veces más etanol que los mismos con 1% de glucosa.

Los cultivos que experimentan una mayor aproximación al valor teórico de 3 son los que se encuentran en condiciones más drásticas, es decir, con 50 ppm del Aroclor 1242. Agrupados los cultivos en función de las cantidades de Aroclor añadidas, se constata una tendencia a aproximarse al valor del control, según aumenta el grado de cloración del

Aroclor empleado, o lo que es lo mismo según disminuye su toxicidad. Asimismo, esta tendencia es más acusada en los cultivos con 25 ppm que en los dosificados con 50 ppm. Así pues y resumiendo, los cultivos que tienen concentraciones bajas de Arocloros menos tóxicos, tienden a aproximarse al nivel del control, mientras que los cultivos con concentraciones altas de los Arocloros más tóxicos, tienden hacia el valor teórico.

10. INCIDENCIA DE LOS PCBs SOBRE LA ACTIVIDAD - -
ALCOHOL DESHIDROGENASICA DE *Saccharomyces cerevisiae*

En el capítulo anterior se llegó a la conclusión de que la concentración y el tipo de Aroclor condicionan notablemente la cantidad de alcohol producida. Con el objeto de profundizar en el conocimiento de la acción tóxica de los - PCBs, se llevó a cabo el estudio de las implicaciones de dichos componentes xenobióticos sobre la actividad de la - alcohol deshidrogenasa, como se describe en la parte experimental.

Los resultados obtenidos, resumidos en las figuras 51 y 52, ponen de manifiesto que la adición de los Arocloros - 1242, 1248, 1254 y 1260 originan una depresión de la actividad de la alcohol deshidrogenasa respecto a la que presentan los cultivos control. Esta disminución es tanto más intensa cuanto mayor es la concentración del xenobiótico añadido, ya que con 25 ppm la inhibición es del orden del 37%, mientras que 50 ppm producen unos niveles de inhibición - próximos al 50%. Sin embargo, no se ha podido constatar - ninguna correlación entre grado de cloración y disminución de la actividad enzimática, ya que, además de no observarse ninguna tendencia que permita afirmar la preponderancia tó-

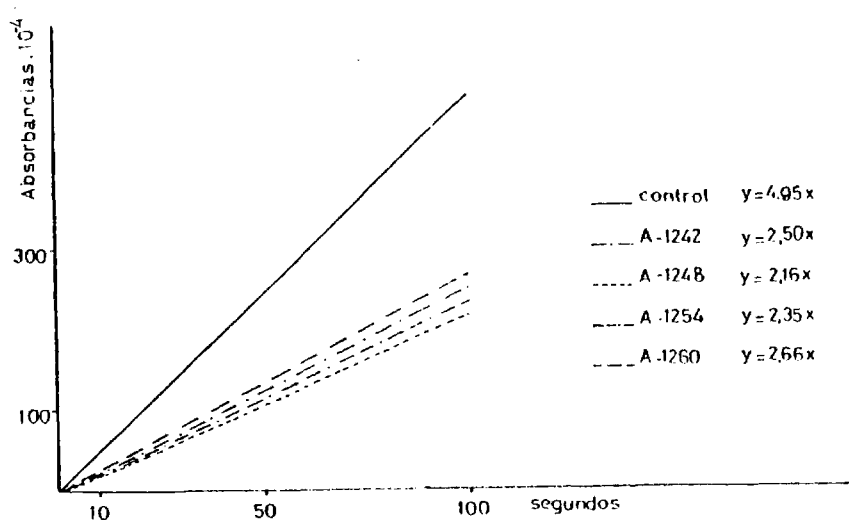


Fig. 51. Incidencia de 25 ppm de diferentes Aroclor - sobre la actividad alcohol deshidrogenásica de *S. cerevisiae* en medio glucosado al 1%.

xica de un Aroclor sobre otro entre los ensayados, como las diferencias existentes entre los máximos y los mínimos de inhibición son muy pequeñas, resulta problemático la asignación de efectos debidos a esta causa.

De estos resultados cabe deducir ciertas analogías en lo que se refiere a la acción de los PCBs sobre la actividad de la alcohol deshidrogenasa del *Saccharomyces cerevisiae*.

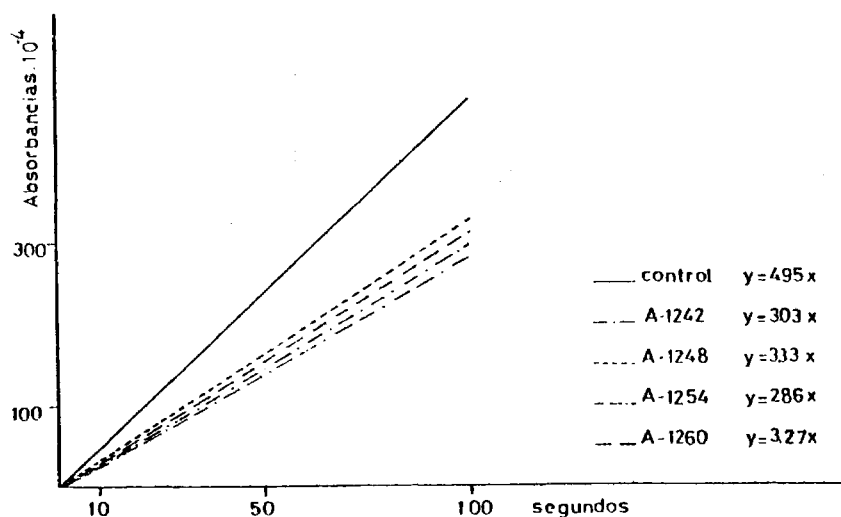


Fig. 52. Incidencia de 50 ppm de diferentes Arocloros sobre la actividad alcohol deshidrogenásica de *S. cerevisiae* en medio glucosado al 1%.

Así, en ambos casos, la adición de PCBs ocasiona inhibiciones que son tanto más intensas cuanto mayor es la cantidad de xenobiótico añadido, no constatándose, sin embargo, en el caso de la actividad enzimática, influencia significativa del grado de cloración sobre la misma.

De lo anteriormente expuesto, se infiere que la disminución de la actividad alcohol deshidrogenásica detectada en los cultivos con Aroclor debe repercutir, favoreciéndola, en la depresión de etanol. Ahora bien, es muy probable que la

de la alcohol deshidrogenasa no sea la única actividad enzimática susceptible a la acción de los PCBs, ya que éstos ocasionan sustanciales diferencias en la cantidad de alcohol formado en dependencia del grado de cloración, mientras que la actividad alcohol deshidrogenásica no se ve afectada por esta causa. Es pues pausable suponer que otras etapas del proceso fermentativo, anteriores a la considerada, se vean asimismo afectados por la presencia de los PCBs.

Ambos enzimas-catalasa y alcohol deshidrogenasa-, - que están en íntima conexión con los procesos respiratorios de *S. cerevisiae*, ven afectada su actividad por la presencia de los productos xenobióticos considerados, de forma que la adición de 25 ppm ocasionan una depresión media de 37% - tanto en el caso de la alcohol deshidrogenasa, como en el de la catalasa. No aparecen más analogías en respuesta a los - PCBs y sí sustanciales diferencias de comportamiento, ya que la adición de 50 ppm de PCBs a los cultivos de *S. cerevisiae* aumenta el nivel de inhibición hasta un 50% en el caso de la alcohol deshidrogenasa, pero no incide en el de la catalasa que se mantiene en valores del orden del 37%; el incremento de la cantidad de Aroclor adicionado no ocasiona posteriores elevaciones en los niveles de inhibición de la actividad catalásica. Por otra parte, la actividad alcohol

deshidrogenásica no se ve afectada específicamente por el porcentaje de cloración de los Arocloros empleados. Sin embargo, la actividad catalásica decrece en las células de la levadura de forma inversa al grado de cloración de los mismos. Pese a ésta, en cierto modo diferente respuesta frente a los PCBs, el hecho primordial que se deriva de estas experiencias radica en que ambas actividades enzimáticas, relacionadas con procesos de transporte electrónico, se ven afectadas desfavorablemente por la presencia de los compuestos xenobióticos ensayados.

Lo expuesto corrobora los antecedentes existentes en la bibliografía (Pardini, 1970, 1971; Nelson, 1971; Sivalingen, 1973) acerca de las implicaciones de diferentes compuestos organoclorados como desacopladores del transporte electrónico en sistemas mitocondriales de diferentes órganos de mamíferos, y asimismo apoyan la tesis de Tejedor (1977) de que los efectos de los PCBs consisten en el bloqueo parcial de la cadena de transporte electrónico a nivel de los citocromos.

201

IV. CONCLUSIONES

1) La adición de PCBs individuales (2,2'-diclorobifenilo; 2,4'-diclorobifenilo; 2,5,2'-triclorobifenilo; - 2,5,2',5'-tetraclorobifenilo) o de mezclas de éstos (A-1232, A-1242, A-1248, A-1254 y A-1260) a cultivos de - *Saccharomyces cerevisiae*, no comporta, en ningún caso, - transformación alguna del xenobiótico por parte del microorganismo.

2) La respuesta de la levadura a la presencia de - diferentes tipos de PCBs -evaluada en términos de variación de biomasa- puede esquematizarse en los siguientes - términos:

- a) En medio fermentable todos los Arocloros ensayados inhiben el crecimiento de la masa celular.
- b) En medio no fermentable los Arocloros menos clorados originan un decaimiento de la biomasa, -- mientras que los de mayor grado de cloración estimulan ligeramente el crecimiento del microorganismo.
- c) Los efectos tóxicos constatados se revelan más acusados en el caso de que las células de - *Saccharomyces cerevisiae* crezcan en medio no fer-

mentable que si lo hacen en medio fermentable. -
Así, para cultivos etanolados adicionados con -
Aroclor 1232 la DI_{50} se estima en 47,9 ppm,
mientras que en el caso de cultivos glucosados se
evalua en 25 ppm.

3) Existe una correlación inversa entre toxicidad y
grado de cloración, de forma que los Arocloros menos clora-
dos resultan ser los más tóxicos.

4) Los xenobióticos ensayados se acumulan en las -
células de *Saccharomyces cerevisiae*, en primer término, en
función de la edad del cultivo y en segundo en función del
porcentaje de cloración del Aroclor, de tal forma, que la -
acumulación es máxima en los Arocloros menos clorados y en
las primeras horas de desarrollo de los cultivos.

5) Los mecanismos activos de transporte no intervie-
nen en el proceso de acumulación de los PCBs, siendo los -
mecanismos pasivos los responsables de la bioconcentración
del xenobiótico, cuyas contribuciones fundamentales son de-
bidas a procesos de adsorción (cifrables en un 20% del total)
y de reparto agua/lípidos celulares.

6) Cabe desechar la actuación de los PCBs como posibles inductores de cambios mutagénicos, ya que, además de los antecedentes bibliográficos, en cultivos cuyo inóculo - ha sido previamente habituado al xenobiótico, la dinámica de crecimiento de la biomasa no sufre alteración alguna si se la compara con la obtenida para cultivos no habituados.

7) La adición de los diferentes Arocloros a cultivos glucosados de *Saccharomyces cerevisiae* deprimen los niveles de lípidos totales, mientras que en medio no fermentable, - los menos clorados originan una depresión, y los más clorados una ligera estimulación.

8) La adición de Aroclor 1254 a cultivos glucosados y etanolados ocasionan un decaimiento de los niveles de fósforo, tanto más elevado cuanto mayor es la concentración de xenobiótico añadido.

9) La dosificación de cultivos en medio fermentable y no fermentable con diferentes mezclas de PCBs, comporta en todos los casos una disminución del total de ácidos grasos, excepción hecha de los cultivos etanolados y suplementados con los Arocloros de mayor índice de cloración.

10) La depresión (o en su caso estimulación) especificada en el apartado anterior, es mínima en el caso de los ácidos grasos saturados, mientras que en los insaturados se aprecia una notable influencia del xenobiótico, que representa un 56% de inhibición en las primeras horas de cultivo. Parece pues deducirse una intervención de los PCBs en aquellos procesos metabólicos que requiere la intervención de oxígeno molecular, como es el caso que nos ocupa.

11) El proceso biosintético de los esteroides integrantes de la subfracción insaponificable de la fracción lipídica es ligeramente estimulado por la presencia de los diferentes PCBs en relación directa a su grado de cloración. Sin embargo, una de las reacciones de dicho proceso, concretamente la epoxidación del escualeno, se ve afectada por la presencia de los Arocloros de forma inversa al grado de cloración.

12) La actividad catalítica de las células de *Saccharomyces cerevisiae* decae a consecuencia de la presencia de los diferentes PCBs. Este decaimiento se correlaciona de forma inversa con el grado de cloración, pero no con el aumento de la dosis de xenobiótico adicionado, ya que a partir

de una determinada concentración (25 ppm) no se constatan posteriores incrementos de la inhibición.

13) La capacidad fermentativa del *Saccharomyces cerevisiae* se ve afectada negativamente por la presencia de los xenobióticos ensayados. Esta depresión constatada permite comparar la toxicidad -a este respecto- de los PCBs con la de ciertos insecticidas organoclorados, y así los Arocloros más clorados son menos tóxicos que los insecticidas derivados del hexaclorociclohexano y del diclorodifenil-etano, mientras que la toxicidad de los menos clorados es menor que la de los insecticidas ciclodiénicos.

14) La actividad alcohol deshidrogenásica se ve parcialmente inhibida por la presencia de los diferentes PCBs, sin que el grado de cloración incida significativamente en el proceso.

15) Dado que la microflora edáfica contribuye de forma fundamental a los procesos de degradación de los hidrocarburos presentes en la naturaleza, y pese a lo incorrecto de extrapolar los resultados obtenidos con una sola especie a toda la microflora, del hecho de que la levadura estudiada

sea incapaz de degradar estructuras como las ensayadas y que, por el contrario, éstas afecten a actividades básicas del microorganismo, se deducen los riesgos que, a nivel ambiental, comporta el empleo masivo de los PCBs, coincidiendo en ello con la idea apuntada por Gresshoff (1977) y discrepando de lo expuesto por Klein (1970) en el sentido de que para este autor los PCBs no conllevan efecto nocivo alguno de tipo ambiental.

V. BIBLIOGRAFIA

- Ahmend, M.; D.D. Focht: Bull. Envirom. Contamin. Toxicol. 10, 70 (1973).
- Ander, D.W.; J.J. Hickey; R.W. Risebrough; D.F. Hughes; R.E. Christensen.- Can. Field. Naturalist., 83, 89 (1969)
- Anderson, K.; C.A. Nilsson; A. Norström; C. Rape: PCB Conference, General Discussion, Stockholm (1972)
- Bailey, S.; P.J. Bunyan: Nature, 34, 236 (1972)
- Baluja, G. Agroquim. Tecnol. Aliment. 7, 335 (1967)
- Baluja, G.; M.A. Murado; L.M. Hernandez: Bull. Envirom. Contamin. Toxicol. 17, 603 (1977).
- Barlett, C.R.: J. Biol. Chem, 234, 466 (1959).
- Biezenski, J.J.: J. Lipid. Res. 3, 120 (1962)
- Block, W.D.; H.H. Cornish: J. Biol. Chem. 234, 3301 (1959)
- Bloomfield, D.K.; K. Bloch: Biochim. Biophys. Acta 30, 220 (1958).
- Bloomfield, D.K.; K. Bloch: J. Biol. Chem. 235, nº 2 (1960)
- Bonnichsen, R.K.; B. Chance; H. Theorell: Acta Chem. Scand. 1, 685 (1947)
- Bonnichsen, R.K.; H. Theorell: Scand. J. clin. Lab. Invest. 3, 58 (1951).

- Böttcher, C.F.F.: F.P. Woodford; E. Boelsma Van Houte, C.M. Van Gent: Rec. Trav. Chim. 78, 794 (1959).
- Breivik, O.N.; J.L. Owades; R.F. Light: J. Org. Chem., 19, 1734 (1954).
- Brock, T.D.: Biología de los microorganismos 216, Ed. Omega, Barcelona (1978).
- Buchenauer, H.: Pest. Biochem. y Physiology 7, 309 (1977).
- Buchenauer, H.: Pest. Sci. 9, 507-512 (1978).
- Carey, A.E.; G.R. Harvey: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 527 (1978).
- Dahlgren, R.B.; R.L. Linder: J. Wildlife Management, 36, (1972).
- Dawson, H.: Biochem. S.; 75, 45 (1960).
- De Faubert, M.; H. Egan; E.W. Codly; E.W. Hammond; J. Roburn; J. Thompson: Analyst, 89, 168 (1964).
- Dulaney, E.L.; E.D. Stapley; K. Simpf: Appl. Microbiol. 2, 371 (1954).
- Duke, T.W.; J.I. Lowe; R.F. Reidinger: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 5, 171 (1970).
- Fiske, C.H.; Y. Subbarow: J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).

- Folch, J.; I. Ascoli; M. Lees; J.A. Meath, F.N. Lee Baron: J. Biol. Chem. 9, 833 (1951).
- Folch, J.; M. Lees; G.H. Sloane Stanley: J. Biol. Chem., 226, 497 (1957).
- Foster, J.W.: "The Oxygenases", Academic Press, 241 New York (1962).
- Fries, G.F.: Adv. Chem. Ser. 111, 256 (1972).
- Goto, M.; K. Sugiura; M. Hattori; T. Miyagawa; M. Okamura: Chemosphere 3, 233 (1974)
- Goto, M.; K. Sugiura; M. Hattori; M. Okamura: Chemosphere 3, 227 (1974a).
- Grant, D.L.; W.E.J. Phillips; D.C. Villeneuve: Bull. Environ. Contam. Toxicol. 6, 102 (1971).
- Greb, W.; W. Klein; F. Coulston; L. Goldbert; F. Korte; Chemosphere 2, 143 (1973).
- Greb, W.; W. Klein; F. Coulston; L. Goldberg; F. Korte: Environ. Quality Safety, 5, 253, Academic Press, New York (1976).
- Green, D.E.; D.W. Allmann: Metabolic Pathways, Vol. 2, 37, Academic Press, New York, (1968).
- Greer, D.E.; J. Keil: Bull. Environ. Cont. Toxicol., 12, 3 (1974).

- Gresshoff, P.H.; H.K. Mahanty; E. Gartner: Bull. Environment Cont. Toxicol. 17, 690 (1977).
- Hansen, D.F.; P.R. Parrish; J.I. Lowe; A. J. Wilson: Bull. Envirom. Cont. Toxicol. 6, 113 (1971).
- Heath, R.G.; R.W. Risebrough.- XV Congress Internat. Ornitol., La Haya, Sept. 1970 (1972).
- Hernandez, L.M.; G. Baluja: Doñana Acta Vertebrada, 3, 157 (1976).
- Hernandez, L.M.; M.J. González; G. Baluja: Agroquim. Tecnol. Aliment. 16, 279 (1976).
- Higuchi, K: Fukuoka Igasu Zasshi, 62, 1 (1971). Ref. en Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 11, 213 (1974).
- Holden, A.V.; Pest. Monit. J., 4, 117 (1970)
- Holub, B.J.; J. Plekarski; K. Nilsson: Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 14, 415 (1975).
- Horning, E.C.; W.J.A. Vanden Heuvel; B.G. Greech: Methods of Biochemical Analysis, XI, Interscience, N.Y. (1963).
- Horning, E.C.; T. Luukkainen; E.D.A. Hahti; B.G. Greech; W.J.A. Vanden Heuvel: Recent Progress in Hormone Research, XIX, Academic Press. N.Y. (1963 a).

- Horwitz, W.: Methods of Analysis. A.O.A.C. 10^e Ed., p. 873, A.O.A.C. Publ., Washington (1965).
- Hunter, K.; A.H. Rose: The Yeast, II, 211., Academic Press., N.Y. (1971).
- Huster, K.; F. Korte: Chemosphere, 3, 153 (1974),
- Hutzinger, O.; W.D. Jamieson; S. Safe; V. Zitko: ACS, 164 th National Meeting Div. Water, Air and Waste Chemistry, 74 (1972)
- Hutzinger, O.; D.M. Nash; S. Safe; A.S.W. De Freitas; R.J. Norstrom; D.J. Wildish; V. Zitko. Science 178, 312 (1972 a).
- Idler, D.R.; L.H. Safe: Stecoids 19, 3, 315 (1972).
- Jayaraman, J.; C. Cotman; H.R. Mahler; C.W. Sharp: Arch. Biochem. Biophys. 115, 224 (1966).
- Jensen, H.L.; Acta. Agr. Scand. 13, 404 (1963)
- Jensen, J.; A.G. Johnels; S. Olsson; G. Otterlind: Nature, 224, 247 (1969).
- Jensen, S.; G. Sundström: Ambio, 3, 70 (1974).
- Kahane, E.: c. r. hebdom. Scand. Acad. Sci., Paris 257, 1966 (1969) Ref. en The Yeast, II, 214 Academic Press, N.Y. (1971).

- Kahane, E.; M. Th. Regord: Ann. Nutr. Aliment., 18, 1-21 (1964).
- Kamal, M.: Envirom.Quality Safety, Vol. 5, 248, Academic Press, 248 New York (1976).
- Kates, M.: J. Lipid. Res. 5, 132 (1964).
- Kato, T.; S. Tanaka; M. Veda; Y. Kawase: Agr. Biol. Chem. 39, 169 (1975).
- Kato, T.; Y. Kawase: Agr. Biol. Chem. 40, 2379 (1976).
- Katsuki, S.: Fukuoka Igasu Zasshi, 60, 409 (1969). Ref. En Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 11, 213 (1974).
- Kearney, P.C.; R.G. Nash; A.R. Isensee: Chemical Fallout, 54, Charles C. Thomas, Publ. Springfield, Illinois (1969)
- Keil, J.E.; L.E. Priester; S.H. Sandifer: Bull Envirom. Contam. Toxicol. 6, 156 (1971).
- Keil, J.E.; L.E. Priester; S.H. Sandifer: Envirom. Health Presp, 1, 1975 (1972).
- Klein, W.; I. Weisgerber: EnviromQuality and Safety, 5, p. 237, Academic Press (1976)
- Letters, R.: J. Inst. Brew. 68, 318 (1962) Ref. en The Yeast, II, p. 214, Academic Press N.Y. (1971).

- Lichtenstein, E.P.; K.R. Schulz; T.W. Fuhremann; T.T. Liang: J. Econ. Entomol. 62, 761 (1969)
- Longley, R.P.; A.H. Rose; B.A. Knights: J. Biochem. 108, 401 (1968).
- Metcalfe, L.D.; A.A. Schmitz: Anal. Chem. 38, 514 (1966)
- Moilamen , K.W.; D.G. Crosby: 165 th. Amer. Chem. Soc. Meeting. Dallas. Texas (1973)
- Moss, C.; M.A. Lambert; M.H. Merwin: Appl. Microbiol., 80, 3 (1974).
- Moza, P.; I. Weisgerber; W. Klein; F. Korte: Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 12, 54 (1974).
- Muller, W.P.; F. Korte: Naturwiss: 61, 326 (1974)
- Muller, W.P.; Dissertation Universität Bonn (1974 a)
Ref. en Envirom. Quality and Safety, 246, Academic Press, N.Y. (1976).
- Muller, W.P.; H. Rohleder, W. Klein; F. Korte: Gesellschaft für Strahlen und Umwelt forschung GmbH, München, GSF-Berich Ö 104 (1974 b) . Ref. en Envirom. Quality and Safety, 246, Academic Press, N.Y. (1976).
- Nathan, O.K.; M. Cioti: Methods in Enzymology. Vol. III Academic Press. New York. (1971).
- Nelson, B.D.; C. Williams: J. Agr. Food. Chem. 19, (2), 339 (1971).

- Nevenzel, J.C.; R. Waldtraut; J.F. Mead: *Biochem.* 8, 1589 (1965).
- Onley, J.H.; Mills, P.A.: *J.Ass. Off. A. Chemist.* 45, 983, (1962).
- Pacheka, J.; D. Sitkiewicz: *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Biol.* 19, 17 (1971).
- Pacheka, J.; B. Krolwska: *Bull. Envirom. Contam. Toxicol.* 13, (3), 342 (1977).
- Pardini, R.S: *Bull. Envirom. Contam. Toxicol.* 6, (6), 539 (1971).
- Penningh, C.H.: *Ind. Eng. Chem.*, 22, 1180 (1930)
- Presst, I.; N.W. Moore: *Envirom. Pollution*, 1, 3 (1970)
- Racker, E: Methods in Enzymology: Vol. I. Acad. Press, New York, 500 (1955).
- Rappe, C.: 167 th. National Meeting Americal Chemical Society. Chicago, Illinois (1973).
- Reindel, F.: *Justus Leibigs Annln. Chem.* 544, 116 (1940)
Renf. en "The Yeast", II, 217, Academic Press, N.Y. (1971)
- Risebrough, R.W.; P. Rieche; D.B. Peakall; S.G. Hermen; M.N. Kirven: *Nature*, 220, 1098 (1968).
- Rose, A.H.; Microbiología Química: 310, Ed. Alhambra, Madrid (1969).

- Rouser, G.; G. Kritcheusky; A. Yamamoto: Lipid Chromatographic Analysis, Vol. 1, 99, Ed. G.V. Marinett, Edward Arnold, London. (1967).
- Ruiz-Herrera, J.; R.L. Starkey: J. Bacteriol. 99, 544, (1969).
- Satyaswaroop., P.G.; E. López de la Osa; E. Gurpide: Steroids, 30, 141 (1977).
- Schatz, G.; W. Rouslin: Biochem.Biophys. Res. Comm. 37, 1002 (1969).
- Shenk, H.; J.L. Gellerman: Anal. Chem. 32, 1412 (1960)
- Schmidt, H.; G. Schultz.: Ann. Chem. 207, 338 (1881).
- Schulte, E.; L. Acker: Naturwissenschaften, 61, 79 (1974).
- Sinclair, R.G.; J. Biol. Chem. 174, 343 (1948).
- Singh, R.; L. Iyengar; R.A.O. Prabhakara: J. Ferment. Technol. 55, 281 (1977).
- Sitriewicz, D.; Z. Zalewska: Neuropat. Pol. 13, 463 (1975)
- Sivalingen, P.M.; T. Yoshida; Y. Inada: Bull. Envirom. Contamin. Toxicol. 10, 242 (1973).
- Smith, R.H.: Biochem. J. 57, 140 (1954)
- Sperry, W.M.: J. Lipid Research 4, 221 (1963).

- Stoffel, W.; F. Chu; E.H. Ahrens: Analyt. Chem. 31, -
307 (1959).
- Summer, B.; A.L. Dounce: Methods in Enzymology, II,
775, Academic Press, N.Y. (1955).
- Tanaka, K.: Fukuoka Igaku Zasshi, 63, 347 (1972). Ref.
en: Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 11, 213 (1974).
- Tejedor, M.C.: Tesis Doctoral. Universidad Complutense
de Madrid (1977)
- Usden, V.R.; R.C. Burrell: Archs. Biochem. Biophys, 36,
172 (1952).
- Urey, J.C.; J.C. Kricher; J.M. Boyland: Bull. Envirom.
Contam. Toxicol. 16, 81 (1976).
- Van den Heuvel, W.J.A.; C.C. Sweeley; E.C. Horning:
J. Am. Chem. Soc. 82, 3481 (1960).
- Van den Heuvel, W.J.A.; E.D.A. Haahti; E.C. Horning:
J. Am. Chem. Soc., 83, 1513 (1961).
- Veight, G.D.: University of Wisconsin, Madison, Wisconsin
(1970). Ph. D. Thesis.
- Voerman, S.; M.L. Tammes: Bull. of Envirom. Contam.
Toxicol. 4, 5 (1969)
- Vorbeck, M.L.; G.V. Marnetti: J. Lip. Res. 6, 3 (1965)

- Vos, J.G.; J.H. Koeman, : Toxicol. Applied Pharmacol. 17, 656 (1970)
- Vos, J.G.; H.L. Vab der Maas; M.C. Ten Noewer De Brauw; R.H. de Vos: Food Cosmetic Toxicol., 8, 625 (1970a)
- Wieland, H.; W.H. Stanley: Justus Leibigs Annln.Chem. 489, 31 (1931). Ref. "The Yeast II, 225 Academic Press. N.Y. (1971).
- Wieland, H.; W. Benend: Phys. Chem. 274, 215 (1942).
- Westley, J.; J.J. Wrem; H.K. Milchell: J. Biol. Chem. 229, 131 (1957).
- Wildish, D.J.; Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 5, 202, (1970)
- White, A.; P. Hanaler; E.L. Smith: Principios de Bioquímica, 519, Ediciones del Castillo, Madrid (1970).
- Wong, P.T.S.; K.L.E. Kaiser: Bull. Envirom. Contam. Toxicol. 13, 249 (1975).
- Yamaguchi, K: Spectral data of natural products, Vol. I. 199, , Elsevier Publishing Company, N.Y. (1970)
- Yehida, M.; N. Kurihara; T. Fugita; M. Nakajima: Pest. Biochem. Physiol. 4, 260 (1974).
- Zitko, V.; P.M. K. Chai: Fisheries Research Board of Canada, Technical Report 272 (1971).

